

Université de Montréal

**MODULATION DE L'EXPRESSION ET DE LA LOCALISATION DE LA
CONNEXINE 43 PAR DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES
DANS LES CELLULES FOLLICULOCELLAIRES DE L'HYPOPHYSE
ANTÉRIEURE**

Par

MARIE-EVE FORTIN

Département des Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

11612574

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

Novembre 2004

© MARIE-EVE FORTIN, 2004



W

4

U58

2005

V.040

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**MODULATION DE L'EXPRESSION ET DE LA LOCALISATION DE LA
CONNEXINE 43 PAR DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES
DANS LES CELLULES FOLLICULOCELLAIRES DE L'HYPOPHYSE
ANTÉRIEURE**

présenté par :

Marie-Ève Fortin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Maria Leiza Vitale..... Directrice de recherche

Dr. R-Marc Pelletier..... Codirecteur de recherche

Dr. Bruce Murphy.....Président Rapporteur

Dr. Louis Gaboury..... Membre du jury

Mémoire accepté le :

RÉSUMÉ

Les cellules folliculostellaires (FS) forment un réseau tridimensionnel dans l'hypophyse antérieure. Ces cellules sécrètent et sont la cible de nombreuses cytokines régulatrices des systèmes neuroendocrinien et immunitaire. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α sur l'expression et la localisation de la protéine Cx43, une composante des jonctions gap, dans les cellules TtT/GF, une lignée de cellules FS. Nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la forme non-phosphorylée (NP-Cx43) et un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la sérine 368 (P-Cx43) de la Cx43. Nos résultats en immunofluorescence ont montré la localisation de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire avec une certaine co-localisation avec l'appareil de Golgi et une plus importante co-localisation avec les lysosomes. La P-Cx43 se retrouve sur la membrane plasmique. L'exposition des cellules à l'IL-1 β et au TNF α augmente l'association de la NP-Cx43 aux lysosomes et à la membrane plasmique et l'association de la P-Cx43 à la membrane plasmique. Ces résultats furent confirmés par des expériences d'immunobuvardage sur des fractions membranaires et cytosoliques. Des analyses en microscopie confocale démontrent la co-localisation des deux formes de la Cx43 à la membrane plasmique et dans la région périnucléaire pendant le traitement aux cytokines. De plus nous avons démontré que dans les cellules TtT/GF la Cx43 est dégradée par la voie des lysosomes et par la voie des protéasomes en présence et en absence de cytokines. Le TNF- α et l'IL-1 β stimulent la communication intercellulaire des cellules

TtT/GF. Enfin, nous avons trouvé une modulation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans des hypophyses antérieures de vison mâles durant le cycle annuel reproductif. Ces résultats indiquent que les cytokines pro-inflammatoires modulent l'expression et la localisation de la Cx43 dans les cellules FS et ainsi elles pourraient moduler la communication intercellulaire de l'hypophyse antérieure.

MOTS CLÉS : cellules folliculostellaires, communication intercellulaire, cytokines pro-inflammatoires, Cx43.

SUMMARY

Folliculostellate cells (FS) form a tridimensionnal network of functionally interconnected cells within the anterior pituitary. FS cells secrete and are target of a large number of cytokines capable of regulating the neuroendocrine and immune systems. In this study, we have studied the effect of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α on the gap junction protein connexin 43 (Cx43) expression and localization in TtT/GF cells, a FS cell line. Two different antibodies against Cx43 were used : anti-NP-Cx43 and anti-P-Cx43 that recognize Cx43 that is not phosphorylated and Cx43 that is phosphorylated on the serine 368 respectively. Immunofluorescence studies showed that NP-Cx43 was mostly intracellular, with some colocalization with the Golgi appartus and a larger co-localization with lysosomes. P-Cx43 was localized on the plasma membrane. Western blot results carried out with membrane- and cytosol- enriched fractions showed that treatment of the cells with IL-1 β or TNF α increased NP-Cx43 association with the lysosomes and the plasma membrane, and increased the association of P-Cx43 with the plasma membrane. Confocal microscopy analyses showed that the two forms of Cx43 co-localize on the membrane and in the perinuclear region. We found that Cx43 degradation involves the lysosome and the proteasome pathways in TtT/GF cells either in the presence or in the absence of cytokines. We observed that IL-1 β and TNF α enhanced intercellular communication in TtT/GF cultures. Finally, we found that NP-Cx43 and P-Cx43 levels were modulated in the mink anterior pituitary during the annual reproductive cycle. Our results show that pro-inflammatory cytokines modulate

the expression and localization of Cx43, thus affecting intercellular communication. The results suggest that these cytokines modulate the communication between FS and the surrounding cells during inflammation.

KEY WORDS : Folliculostellate cells, cell communication, pro-inflammatory cytokines, Cx43.

TABLE DES MATIÈRES

PAGES

Page titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Summary.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des schémas.....	xiii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des abréviations.....	xviii
Dédicace.....	xxii
Remerciements.....	xxiii
1.INTRODUCTION.....	1
1.1. HYPOPHYSE.....	1
1.2. LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES.....	3
1.2.1. Les fonctions des cellules folliculostellaires.....	4
1.2.2. Les cellules FS et le système immunitaire.....	5
1.2.3. Les cellules FS et la croissance cellulaire.....	6
1.2.4. Les cellules FS et le contrôle de la sécrétion hormonale.....	7
1.2.5. Le réseau des cellules FS.....	8

1.3. LES JONCTIONS GAP.....	9
1.3.1. L'assemblage et le désassemblage des jonctions gap.....	10
1.3.2. Les jonctions gap et la différenciation et la croissance cellulaire...	12
1.3.3. Les jonctions gap et la signalisation intercellulaire.....	14
1.4. HÉMICANAU.....	14
1.4.1. Ouverture des hémicanaux.....	15
1.4.2. Les rôles des hémicanaux.....	16
1.5. LES CONNEXINES.....	18
1.5.1. La structure moléculaire des connexines.....	20
1.5.2. Les modifications post-traductionnelles des connexines.....	21
1.5.3. LA CONNEXINE 43.....	21
1.5.4. La phosphorylation de la Cx43.....	22
1.6. LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.....	24
1.6.1. Signalisation de la réponse inflammatoire.....	25
1.6.2. Les cytokines pro-inflammatoires et la communication inter- cellulaire.....	28
1.7. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	29
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	32
2.1. Anticorps.....	32
2.2. Drogues, cytokines et produits chimiques.....	32
2.3. Hypophyse antérieure de vison	33

2.3.1. Préparation des hypophyses antérieures de vison.....	33
2.4. Culture cellulaire.....	34
2.5. Préparation des fractions membranaires et cytosoliques.....	35
2.6. Préparation des fractions subcellulaires des cellules TtT/GF.....	36
2.7. Immunofluorescence.....	39
2.7.1. Préparation des cellules TtT/GF.....	39
2.7.2. Fixation/Perméabilisation.....	39
2.7.3. Blocage des cellules et incubation avec les anticorps.....	40
2.8. Expression de la Pan-Cx43 chez les cellules TtT/GF en absence ou en présence de sérum.....	41
2.9. Expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 après incubation avec des cytokines pro-inflammatoires.....	41
2.10. Effet de l'inhibition de la synthèse de protéines sur l'induction de la NP-Cx43 et la P-Cx43 par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α	41
2.11. Effet de l'inhibition de la voie de dégradation par les lysosomes ou les protéasomes sur l'induction de la NP-Cx43 et la P-Cx43 par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α	42
2.12. Mesure de la communication intercellulaire par absorption de colorant.....	42
2.13. Western blot.....	43
2.13.1. Dosage des protéines.....	43

2.13.2. Électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE.....	43
2.13.3. Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	43
2.13.4. Immunobuvardage des membranes.....	44
2.13.5. Révélation des protéines sur la membrane par cheluminescence..	44
2.14. Quantification des bandes obtenues par Western blot.....	45
3. RÉSULTATS.....	46
3.1 LOCALISATION ET EXPRESSION DE LA CX43 DANS LES CELLULES TtT/GF.....	46
Localisation des formes non phosphorylée, mono- et di- phosphorylées de la connexine 43 dans les cellules TtT/GF en culture.....	46
Caractérisation de la localisation de la pan-Cx43 dans les cellules TtT-GF en présence ou en absence de sérum.....	47
Distribution intracellulaire de la Pan-Cx43 dans les cellules TtT/GF.....	48
Étude sur la localisation intracellulaire de la NP-Cx43 et de sa co-localisation avec différents organites dans les cellules TtT/GF.....	49
Cinétique de l'expression et de la localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF incubées avec l'IL-1 β et le TNF α	50
3.2 ÉTUDES SUR LA CO-LOCALISATION DE LA CX43 APRÈS EXPOSITION AUX CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.....	53
Étude sur la distribution de la NP-Cx43 et la P-Cx43 après exposition à l'IL-1 β ou au TNF α	53

Étude sur la co-localisation de la NP-Cx43 avec des organites après exposition à l'IL-1 β ou au TNF α	54
3.3 EFFET DE SUBSTANCES AFFECTANT LA SYNTHÈSE OU LA DÉGRADATION DE LA CONNEXINE SUR SON EXPRESSION ET SA LOCALISATION DANS LES CELLULES TtT/GF.....	55
Effet de la cycloheximide.....	55
Effet de la leupeptine.....	57
Effet de la lactacystine.....	58
3.4 EFFET DES CYTOKINES IL-1 β ET TNF α SUR LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE DES CELLULES TtT/GF.....	60
3.5 EXPRESSION DE LA CX43 ET DE SES FORMES PHOSPHORYLÉES DANS L'HYPOPHYSE ANTÉRIEURE DE VISON.....	61
4. DISCUSSION.....	110
4.1. CARACTÉRISATION GÉNÉRALE DE LA CX43 DANS LES CELLULES TtT/GF.....	111
Expression et localisation de la Cx43 dans les cellules TtT/GF.....	111
Influence des facteurs sériques sur l'expression de la Pan-Cx43.....	113
Localisation subcellulaire de la Cx43 dans les cellules TtT/GF.....	115
4.2. MODULATION DE LA NP-CX43 ET DE LA P-CX43 DANS LES CELLULES TtT/GF PAR DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.....	118

Effet des cytokines pro-inflammatoires sur l'expression et la localisation de la Cx43	118
Effet de la cycloheximide sur l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.....	120
Le traitement des cellules TtT/GF avec l'IL-1 β et le TNF α augmente l'association de la NP-Cx43 avec les lysosomes.....	124
La Cx43 est dégradée par la voie des lysosomes dans les cellules TtT/GF.	125
Implication des protéasomes dans la dégradation de la Cx43 dans les cellules TtT/GF.....	126
4.3. L'IL-1 β ET LE TNF α AUGMENTENT LA COMMUNICATION INTER-CELLULAIRE ENTRE LES CELLULES TtT/GF.....	129
4.4. L'EXPRESSION DE LA Cx43 DANS L'HYPOPHYSE ANTÉRIEURE VARIE AU LONG DU CYCLE ANNUEL REPRODUCTIF DU VISON.....	130
4.5. CONCLUSION.....	131
BIBLIOGRAPHIE.....	133

LISTE DES SCHÉMAS

- Schéma 1 :** Anatomie générale de l'hypophyse.
- Schéma 2 :** Biosynthèse et dégradation des jonctions gap.
- Schéma 3 :** Représentation de la structure moléculaire de la connexine.
- Schéma 4 :** Voies de signalisation induites par les cytokines $\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$ suite à une inflammation.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Nomenclature des connexines.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Expression et localisation de la Cx43 non phosphorylée, mono- et di- phosphorylée dans les cellules TtT/GF.
- Figure 2 :** Caractérisation de la localisation de la Pan-Cx43 dans les cellules TtT-GF en présence ou en absence de sérum.
- Figure 3 :** Distribution sous-cellulaire de la Pan-Cx43 dans les cellules TtT/GF.
- Figure 4 :** Études en microscopie confocale sur la co-localisation de la NP-Cx43 avec le réticulum endoplasmique rugueux et les lysosomes dans les cellules TtT/GF.
- Figure 5 :** Études en microscopie confocale sur la co-localisation de la NP-Cx43 avec le trans Golgi et les lysosomes de cellules TtT/GF.
- Figure 6 :** Effet de l'IL-1 β sur l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans des fractions membranaires et cytosoliques de cellules TtT/GF.
- Figure 7 :** Effet du TNF α sur l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans des fractions membranaires et cytosoliques de cellules TtT/GF.
- Figure 8 :** Effet de l'IL-1 β sur la localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Figure 9 : Effet du $\text{TNF}\alpha$ sur le marquage et la localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Figure 10 : Études en microscopie confocale sur l'effet de l'IL-1 β sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Figure 11 : Études en microscopie confocale sur l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Figure 12 : Étude en microscopie confocale sur l'effet de l'IL-1 β et du $\text{TNF}\alpha$ sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de TGN38 dans des cellules TtT/GF.

Figure 13 : Étude en microscopie confocale sur l'effet de l'IL-1 β sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de Lamp-1 dans des cellules TtT/GF.

Figure 14 : Étude en microscopie confocale sur l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de lamp-1 dans les cellules TtT/GF.

Figure 15 : Effet de la cycloheximide sur la localisation de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le $\text{TNF}\alpha$.

Figure 16 : Effet de la cycloheximide sur le marquage et la localisation de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le $\text{TNF}\alpha$.

Figure 17 : Effet de la cycloheximide sur l'expression de la NP-Cx43 dans des fractions membranaires et cytosoliques de cellules TtT/GF.

Figure 18 : Effet de la cycloheximide sur l'expression de la P-Cx43 dans des fractions membranaires et cytosoliques de cellules TtT/GF.

Figure 19 : Effet de la leupeptine sur la localisation de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Figure 20 : Effet de la leupeptine sur la localisation de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Figure 21 : Effet de la lactacystine sur la localisation de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Figure 22 : Effet de la lactacystine sur la localisation de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Figure 23 : Effet de l'IL-1 β et du TNF α sur la communication intercellulaire des cellules TtT/GF.

Figure 24 : Variation de l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans l'hypophyse antérieure du vison durant le cycle annuel reproductif.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1P	mono-phosphorylé
2P	di-phosphorylé
ACTH	hormone corticotrophine
ADP	adénosine diphosphate
cADPR	ADP ribose cyclique
AHL	adénohypophysitis lymphocytaire
AMP _c	adénosine monophosphate cyclique
ATP	adénosine triphosphate
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Ca ²⁺	calcium
Cl	fraction cytosolique
Co ²⁺	cobalt
Cx	connexine
Cyt	cytosol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EGF	<i>epithelial growth factor</i>
ERGIC	<i>endoplasmic-reticulum-Golgi- intermediate- compartment</i>
FCS	sérum foetal de veau
FS	folliculostellaire
FSH	hormone folliculostimulante
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>

Gd ³⁺	gadolinium
GH	hormone de croissance
GnRH	hormone de relâche de gonatrophine
HC	hémicannal
IκB	Inhibiteur de kappa B
IKK	kinase IκB
IL-1β	<i>interleukine-1 beta</i>
IL-1RAcP	<i>IL-1 receptor accessory protein</i>
IL-6	<i>interleukine-6</i>
IP ₃	Inositol triphosphate
IRAK	<i>IL-1 receptor associated kinase</i>
kDa	kilodalton
La ³⁺	lanthanum
LH	hormone lutéinisante
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	leukotriène B ₄
Lys	lysosomes
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PMSF	phényl-méthyl-sulfonyl-fluoride
PLA ₂	phospholipase A ₂
μg	microgramme
μM	micromolaire

mg	milligramme
ml	millilitre
Mb	fraction membranaire
Mc	microsome
Ml	mitochondrie légère
mM	millimolaire
MAP	protéines associées aux microtubules
Mg ²⁺	Magnésium
NAD ⁺	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NFκB	nuclear factor κB
Ni ²⁺	Nickel
NP	non phosphorylé
NO	<i>nitric oxyde</i>
PACAP	<i>adenylate cyclase activating peptide</i>
PBS	solution saline-tampon phosphate (<i>phosphate buffered saline</i>)
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PRL	prolactine
RE	reticulum endoplasmique
Ser368	sérine 368
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TPA	<i>tumor promoting agent</i>
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain</i>

TRAFs	<i>TNF receptor-associated factors</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TSH	hormone thyroïdienne
VEGF	<i>vasoendothelial growth factor</i>
VIP	<i>vasoactive intestinal peptide</i>
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
ZO-1	zonula occludens-1

À ma famille et à mon amour pour leur affection et leur soutien.

Je vous aime tous très fort.

Marie-Eve

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de recherche **Dr. Maria Leiza Vitale** pour sa patience et sa disponibilité. Elle a su me conseiller et m'épauler tout au long de ma maîtrise.

Je remercie **Dr. R.M. Pelletier** pour ses conseils et son professionnalisme. Son enthousiasme et ses connaissances m'ont été bénéfiques.

Je voudrais également remercier toute l'équipe que j'ai eue la chance de côtoyer :

Casimir Akpovi pour sa compréhension et son savoir teintés par la philosophie.

Émile Silvas pour sa patience et sa cordialité.

Guifu Zheng et **Li Chen** pour leur gentillesse inépuisable et pour m'avoir ouvert les yeux sur de nouveaux horizons.

Arianne Laliberté, Petru, Melissa Meilleure, et Sara Solinet pour leur soutien technique et moral et pour leur humour propre à chacun.

Je voudrais également remercier **Geneviève Thibault** et **Thao Dang** pour leur soutien, leur amitié et leur complicité que j'ai pu apprécier en leur présence.

Enfin je voudrais chaleureusement remercier ma famille et **Guillaume Goyette** pour leur amour et leurs encouragements dans les moments importants au cours de ma vie.

1. INTRODUCTION

1.1. L'HYPOPHYSE

Longtemps considérée comme la glande endocrine maîtresse, l'hypophyse exerce un rôle prépondérant au niveau de la sécrétion hormonale. Située à la base du cerveau, l'hypophyse est en partie sous le contrôle de l'hypothalamus, une structure appartenant au système nerveux central et relié à l'hypophyse par la tige pituitaire. L'hypophyse se divise en deux parties qui sont distinctes à la fois anatomiquement, embryologiquement et fonctionnellement (Schéma 1) (Allen et Mahesh, 1977).

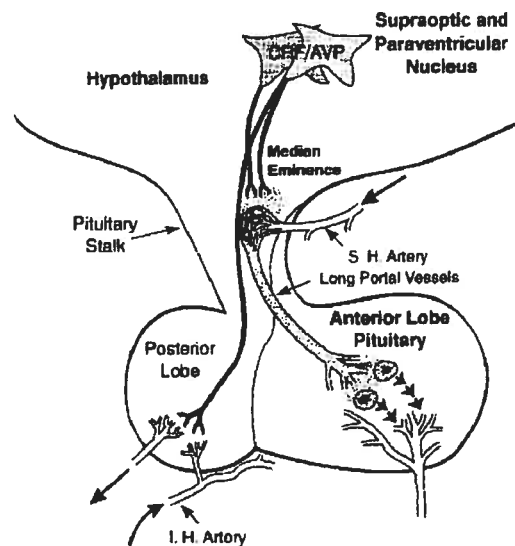


Schéma 1 : Anatomie générale de l'hypophyse. (Turnbull, 1999 modifié)

La neurohypophyse est formée du lobe postérieur (*pars nervosa*). Elle est en fait le prolongement direct de l'hypothalamus. Très vascularisée, la neurohypophyse provient d'un diverticule du plancher du cerveau intermédiaire et contient les terminaisons axonales des neurones dont les corps cellulaires se situent dans les noyaux supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus. La neurohypophyse

libère au besoin des neurohormones (l'ocytocine et l'hormone antidiurétique) via les terminaisons axonales de la *pars nervosa* (Allen et Mahesh, 1977).

L'adénohypophyse est formée d'un lobe antérieur (*par distalis*), d'un lobe intermédiaire (*par intermedia*) et d'une région associée à la tige hypophysaire (*par tuberalis*). Elle tire son origine d'un diverticule du plafond du pharynx primitif qui, durant la vie embryonnaire, va migrer et s'accoler au lobe postérieur pour perdre toute connexion avec la bouche définitive. Le couplage entre l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure est assuré grâce à un réseau de capillaires. Ces capillaires se forment dans l'éminence médiane puis se divisent en vaisseaux plus petits qui descendent le long de la tige hypophysaire pour finalement former un autre système de capillaires dans l'adénohypophyse. Ce système se nomme système porte. Ce réseau permet l'irrigation du lobe antérieur et le drainage des hormones hypophysaires vers les glandes endocrines périphériques (Schéma 1) (Allen et Mahesh, 1977).

L'axe hypothalamo-hypophysaire assure la régulation de fonctions physiologiques importantes. L'hypophyse, sous les commandes de l'hypothalamus et de messages spécifiques, est capable d'interagir avec les glandes endocrines secondaires ou d'autres cellules cibles. Par la suite, les glandes endocrines cibles sécrètent des hormones qui agissent à leur tour sur des organes internes et modulent ainsi les grandes fonctions physiologiques. Les hormones sécrétées par les glandes secondaires peuvent également interagir sur l'hypothalamus et l'hypophyse en inhibant la sécrétion de leurs hormones modulatrices.

L'hypophyse antérieure est constituée de cellules endocrines (gonadotropes, lactotropes, somatotropes, corticotropes et thyrotropes) et de cellules non endocrines (cellules folliculostellaires). Les cellules gonadotropes sécrètent l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Les cellules lactotropes sécrètent la prolactine (PRL). Les somatotropes sécrètent l'hormone de croissance (GH) et les cellules corticotropes et thyrotropes sécrètent respectivement l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et l'hormone de stimulation de la thyroïde (TSH) (Allen et Mahesh, 1977).

L'activité sécrétrice des cellules endocrines de l'hypophyse antérieure peut être influencée par divers facteurs. L'activité peut être régulée par des signaux stimulateurs ou inhibiteurs provenant de l'hypothalamus. Elle peut également être régulée de façon endocrine par des boucles de rétro-action provenant des organes périphériques. De plus, le contrôle de la sécrétion hormonale, de la division et la maturation des cellules hypophysaires peut être influencé par la sécrétion de substances sécrétées à l'intérieur de l'hypophyse antérieure (Benigni et col., 1996, Bernton et col., 1987, Karanth et McCann, 1991, Wang et col., 1996). L'hypophyse antérieure doit posséder un réseau de communication paracrine permettant l'homéostasie de la glande.

1.2. LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES

Les cellules folliculostellaires (FS) ont été décrites pour la première fois en 1953 par Rinehart et Farquhar (1953) comme étant des cellules de forme étoilée dépourvues de vésicules de sécrétion représentant de 5 à 10% des cellules de l'hypophyse antérieure. Ces cellules possèdent de longs prolongements cytoplasmiques reliant d'autres cellules

étoilées de même que des cellules endocrines à l'intérieur de l'hypophyse antérieure formant un réseau tridimensionnel. Deux aspects morphologiques de cellules FS ont été décrits. Des cellules dites «folliculaires», qui se regroupent en follicule et qui possèdent de longs prolongements cytoplasmiques (Rinehart et Farquhar, 1955) et des cellules dites «stellaires» possédant aussi de longs prolongements mais ne formant pas de follicule (Salazar, 1963).

Pendant de nombreuses années, la fonction et l'origine de ces cellules sont restées nébuleuses. Puisque les cellules FS ne possèdent pas de vésicules de sécrétion contenant des hormones, elles ont longtemps été considérées comme étant des cellules endocrines ayant perdu leur différenciation terminale ou encore des cellules souches de l'hypophyse antérieure prêtes à se différencier au besoin (Allaerts et col., 1990). Des études subséquentes ont prouvé que ces cellules étaient matures et différenciées, et qu'elles pouvaient sécréter des molécules capables de moduler l'activité des cellules endocrines. De plus, l'origine embryonnaire de ces cellules est controversée. Certains chercheurs affirment que les cellules FS sont originaires d'un type cellulaire distinct présent dans la poche de Rathke (Gon, 1987). Par contre l'expression chez les cellules FS des protéines S-100 et GFAP (glial fibrillary acidic protein) suggèrent plutôt une origine neuroectodermique (Allaerts et col., 1990).

1.2.1 Les fonctions des cellules FS

Quant à la fonction des cellules FS, plusieurs hypothèses ont été suggérées par rapport à leur morphologie et leur organisation. Certains ont proposé un rôle de soutien pour expliquer l'organisation des cellules en follicule à l'intérieur de l'hypophyse antérieure

(Inoue et col., 1992). La présence de lysosomes dans le cytoplasme des cellules suggère également une activité phagocytaire (Allaerts et col., 1990, Inoue et col., 1992) permettant la dégradation des débris des cellules avoisinantes. Les cellules FS sont aussi capables de produire et de sécréter un grand nombre de facteurs métaboliques. Ces facteurs peuvent être responsables de la modulation de la sécrétion hormonale des cellules endocrines hypophysaires et peuvent également jouer un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire de l'hypophyse antérieure (Lohrer et col., 2000). Il devient de plus en plus évident que les cellules FS ont de multiples rôles à jouer dans le fonctionnement de l'hypophyse antérieure.

1.2.2. Les cellules FS et le système immunitaire

Plusieurs découvertes supportent l'hypothèse d'une activité phagocytaire des cellules FS. Des recherches prouvent la présence de vésicules phagocytaires (Young et col., 1965) et des lysosomes (Kagayama, 1965, Schechter et col., 1988) dans ces cellules. Les cellules FS jouent également un rôle important dans la réponse inflammatoire de l'hypophyse antérieure. Les cellules FS sont les seules cellules de l'hypophyse antérieure à synthétiser l'IL-6 (Vankelecom et col., 1989) une cytokine impliquée dans la réponse immunitaire. Cette cytokine est produite en réponse à certains facteurs comme le « pituitary adenylate cyclase activating peptide » (PACAP) (Tatsuno et col., 1991), le « vasoactive intestinal peptide » (VIP) (Spangelo et col., 1990) et des cytokines pro-inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL- 1β (Kobayashi et col., 1997, Spangelo et col., 1991). À l'inverse, les glucocorticoïdes inhibent la sécrétion d'IL-6 (Carmeliet et col., 1991) par les cellules FS. Le lipopolysaccharide bactérien (LPS) est un activateur important du système immunitaire et permet la libération d'IL- 1β , de

TNF α et d'IL-6 par les monocytes et les macrophages via le récepteur mCD14 en réponse à l'infection. Le LPS est aussi responsable de la stimulation directe de la sécrétion d'IL-6 par les cellules FS via le récepteur mCD14 (Lohrer et col., 2000).

Les cellules FS possèdent aussi certaines similitudes avec des cellules du système immunitaire. Des observations ont démontré une homologie fonctionnelle et morphologique avec les cellules dendritiques (Allaerts et col., 1991). En effet, 10 à 20% des cellules FS expriment à leur surface le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (Allaerts et col., 1996, Bodey et col., 1997) et ainsi ces cellules pourraient être considérées comme des cellules présentatrices d'antigène. Les cellules FS ne semblent pas se différencier à partir de macrophages faute d'avoir été en mesure d'identifier la présence de certains marqueurs classiques de macrophages (HAM56, KP1 et HLA-DR) à la surface des cellules FS (Giometto et col., 1996). Elles sont par contre capables d'éliminer les débris de cellules lactotropes par phagocytose lorsque un grand nombre de cellules lactotropes meurent par apoptose à la fin de la période de lactation (Aoki et col., 1997). Enfin, chez une patiente atteinte d'adénohypophysite lymphocytaire (AHL) associée à une destruction des cellules lactotropes, la présence de cellules FS activées a été démontrée dans les sites de destruction des cellules lactotropes (Horvath et col., 2001).

1.2.3. Les cellules FS et la croissance cellulaire

Le VEGF est l'un des plus importants facteurs impliqué dans la croissance, le développement et la fonction des cellules endothéliales (Gloddek et col., 1999). Le VEGF participe activement à l'angiogenèse c'est-à-dire au développement de

nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement des vaisseaux sanguins existants. Les cellules FS sont les seules cellules de l'hypophyse antérieure à sécréter ce facteur. Les cellules FS synthétisent aussi d'autres facteurs angiogéniques comme le «basic fibroblast growth factor» (bFGF), le «leukemia inhibitory factor» (LIF) ainsi que l'IL-6 (Gloddek et col. 1999, Renner et col., 1998). Elles ont donc un rôle important à jouer dans la vascularisation de l'hypophyse antérieure. Ce rôle explique également le potentiel des cellules FS dans la croissance de tumeurs hypophysaires puisque ces tumeurs sont souvent associées à ce type de cellule.

Toutes les cellules de l'hypophyse antérieure possèdent des récepteurs pour la cytokine IL-6 (Renner et col., 1998). L'IL-6 joue un rôle dans la prolifération des cellules hypophysaires. Alors qu'elle participe à la croissance des cellules FS et des cellules tumorales (Renner et col., 1998), l'IL-6 inhibe la croissance des cellules endocrines non tumorales (Arzt et col., 1993). Les cellules FS peuvent également participer à la prolifération des cellules lactotropes induite par l'estradiol. Le facteur TGF- β 3 (transforming growth factor) produit par les cellules lactotropes sous l'action de l'estradiol est capté par les cellules FS qui relâchent à leur tour du bFGF qui est responsable de l'action mitogénique sur les cellules lactotropes (Oomizu et col., 2004).

1.2.4. Les cellules FS et le contrôle de la sécrétion hormonale

Les cellules FS produisent et sécrètent de nombreux facteurs et cytokines qui ont des répercussions sur la sécrétion des cellules endocriniennes de l'hypophyse antérieure. Les cellules FS produisent et sécrètent les facteurs LIF et IL-6 qui sont responsable entre autre du contrôle de la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes

(Auernhammer et col., 1998). L'IL-6 stimule également la sécrétion de FSH, LH, GH et de PRL (Spangelo et col., 1989). Les cellules FS stimulées par le facteur PACAP sécrètent aussi la follistatine, un facteur inhibiteur de l'action de l'activin A et qui par conséquent inhibe la production de FSH par les cellules gonatotropes (Katayama et col., 2000). Sous l'action des glucocorticoïdes, les cellules FS synthétisent et sécrètent de l'annexin-1 et provoquent ainsi l'inhibition de la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes (Chapman et col., 2002).

L'oxyde nitrique (NO) est un gaz reconnu pour être synthétisé par les cellules endothéliales et causer la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Plusieurs études ont maintenant démontré que le NO exerce plusieurs rôles distincts dans l'organisme dont celui de messenger inter- et intracellulaire (Schwartz, 2000). Des recherches ont identifié les cellules FS et les gonatotropes comme étant les seules cellules de l'hypophyse antérieure qui possèdent l'enzyme de synthèse de NO, la NO synthase. La synthèse et la sécrétion de NO par les cellules FS inhiberait la sécrétion de la LH par les gonatotropes et de la PRL par les cellules lactotropes (Ceccatelli et col., 1993, Duvilanski et col., 1995).

1.2.5. Le réseau des cellules FS et les jonctions gap

Les cellules FS possèdent des prolongements cytoplasmiques qui forment avec les autres cellules de l'hypophyse antérieure un réseau tridimensionnel à travers toute la glande (Vila-Porcile, 1972). La découverte de jonctions gap (aussi nommées jonctions lacunaires ou communicantes) entre les cellules FS (Soji et col., 1997), entre les cellules endocrines (Fletcher et col., 1975), entre les cellules FS et les cellules

gonadotrope (Yamamoto, 1993), et entre les cellules FS et les cellules lactotropes (Wilfinger, 1984, Morand et col., 1996) ouvre une nouvelle perspective sur la communication à l'intérieur de l'hypophyse antérieure. Les jonctions gap permettent le transfert de métabolites et d'ions d'une cellule à l'autre. De plus, les cellules FS sont excitables et donc capables de propager rapidement par ces jonctions des ondes calciques induites ou spontanées de manière tridimensionnelle à travers le réseau qui forme l'intérieur de l'hypophyse antérieure (Fauquier, 2001). La communication à travers les jonctions gap pourrait faciliter et moduler la coordination de la sécrétion des cellules endocrines à l'intérieur de l'hypophyse antérieure (Fauquier et col., 2002).

1.3. LES JONCTIONS GAP

Les jonctions gap sont des jonctions intercellulaires qui permettent le passage de molécules de poids moléculaire pouvant atteindre 1 kDa d'une cellule juxtaposée à l'autre (Guilula et col., 1972). Ces molécules peuvent être de l'eau, des ions, des sucres, des acides aminés, des nucléotides ou encore des seconds messagers comme l'inositol triphosphate (IP_3), le Ca^{2+} et l' AMP_c (Morand et col., 1996). L'ouverture des jonctions gap dépend de certains stimuli comme des hormones et certains facteurs tels l'augmentation de calcium libre intracellulaire, un changement cytoplasmique de pH ou l'utilisation de plusieurs agents pharmacologiques. Il existe une multitude de types de jonctions gap capables de coordonner des activités métaboliques en permettant à certaines cellules de communiquer et d'interagir entre elles sous forme de réseau. Par exemple les cellules musculaires cardiaques peuvent synchroniser leur contractions par des excitations électriques transmises d'une cellule à l'autre par les jonctions gap. Les jonctions gap sont également responsables de l'expulsion des sécrétions des bronches

en coordonnant les battements unidirectionnels des cils de la trachée. La coordination des contractions des muscles lisses de l'utérus durant l'accouchement est également assurée par ces jonctions (Evans et Martin, 2002). Cependant, la fonction des jonctions gap ne se limite maintenant plus à la communication intercellulaire puisque ces jonctions peuvent intervenir dans la différenciation et la croissance cellulaire (Lo et Wessels, 1998, Koffler et col., 2000).

1.3.1. L'assemblage et le désassemblage des jonctions gap

Les jonctions gap sont composées de protéines transmembranaires appelées connexines (Cx) qui peuvent posséder différents poids moléculaires. Après la synthèse des connexines dans le réticulum endoplasmique, ces dernières s'oligomérisent en hexamère pour former des connexons. Dépendant du type de connexine, l'assemblage en connexon peut se produire dans différentes régions spécialisées à travers la voie de sécrétion. La connexine 26 (Cx26) s'oligomérisse majoritairement en connexon à la sortie du réticulum endoplasmique pour ensuite effectuer une translocation directe à la membrane plasmique sans passer par l'appareil de Golgi (Evans et col., 1999). D'autres connexines s'oligomérisent dans une région spécialisée du réticulum endoplasmique, appelée ERGIC (endoplasmic-reticulum-Golgi-intermediate-compartiment) (Falk, 2000). En revanche l'assemblage en connexon de la connexine 43 (Cx43) s'effectuerait dans le réseau transgolgien (Sarma et col., 2002). Après la migration des connexines dans la voie de sécrétion, les connexons de Cx43 sont emmagasinés dans le réseau transgolgien puis transportés à la membrane plasmique par des vésicules (Schéma 2).

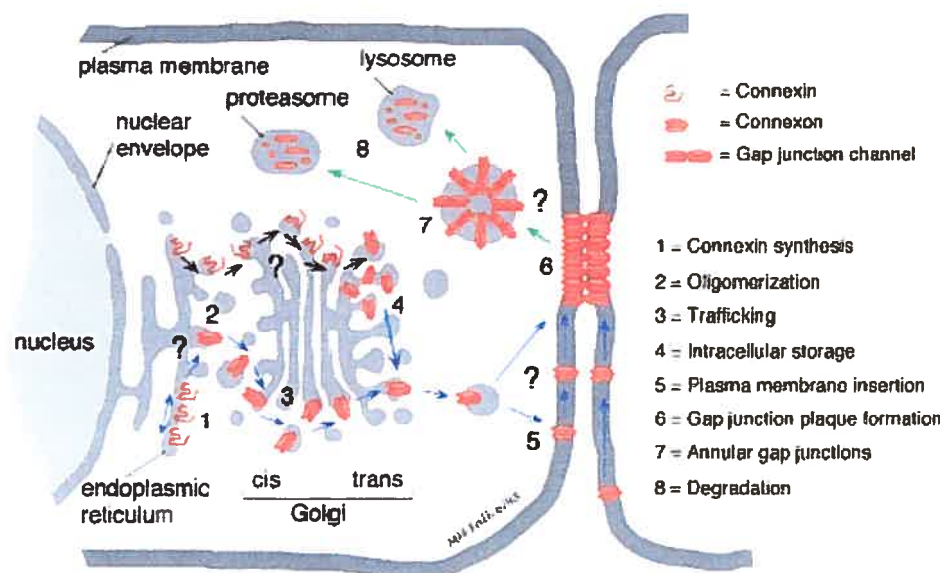


Schéma 2 : Biosynthèse et dégradation des jonctions gap. (Falk, 2000)

Après leur assemblage et leur arrivée à la membrane, tous les connexons migrent dans la membrane plasmique pour s'agglomérer en plaque. La jonction gap est formée de l'assemblage de deux connexons provenant de deux cellules juxtaposées (Schéma 2). Des interactions hydrophobes entre les deux connexons assurent une étanchéité complète entre le canal et l'espace extracellulaire. L'interaction entre les connexons de deux cellules juxtaposées est si grande que la dégradation de ces jonctions implique une internalisation des deux membranes plasmiques avec un minimum de perte de cytoplasme. La dégradation des jonctions gap implique à la fois les lysosomes et la voie de dégradation des protéasomes (Falk, 2000) (Schéma 2). La demi-vie d'une jonction gap est très rapide et peut durer entre 1.5 et 5 heures (Falk, 2000, Musil 2000).

1.3.2. Les jonctions gap et la différenciation et la croissance cellulaire

Les jonctions gap interviennent non seulement dans la communication intercellulaire mais également dans la différenciation et la croissance cellulaire (Lo et Wessels, 1998, Koffler et col., 2000). Certaines connexines sont indispensables au développement embryonnaire alors que d'autres sont impliquées dans la croissance cellulaire chez l'adulte. Chez la souris, la connexine 45 (Cx45) est exprimée durant le stade embryonnaire et jusqu'à deux semaines après la naissance et cette expression est nécessaire au développement du système nerveux central (Maxeiner et col., 2003). De nombreuses lésions tissulaires sont causées par des mutations des connexines qui peuvent provoquer de graves problèmes de développement. Des mutations du gène encodant la connexine 32 (Cx32) provoque une maladie neuromusculaire héréditaire appelée Charcot-Marie-Tooth (Willecke et col., 1999). Cette Cx32 non fonctionnelle provoque une démyélinisation des cellules de Schwann. Des mutations ponctuelles de la Cx43 peuvent occasionner de sévères malformations cardiaques chez certains enfants atteints du syndrome d'Ivermark (Britz-Cunningham et col., 1995). Dans le cristallin, une absence de connexine 46 (Cx46) produit des cataractes sévères alors qu'une absence de connexine 50 (Cx50) induit une cataracte mineure et une diminution de la croissance cellulaire du cristallin (Martinez-Wittinghan et col., 2003). Certaines mutations dans le gène de la Cx26 sont responsables d'une surdité neurosensorielle isolée de transmission autosomique récessive (Mese et col., 2004).

La régulation de la croissance cellulaire est une fonction de la connexine qui est indépendante de sa capacité à former une jonction gap (Moorby et Patel, 2001). Plusieurs chercheurs ont remarqué qu'une diminution de la communication

intercellulaire entraînait une augmentation de la croissance cellulaire *in vitro* et la formation de tumeur *in vivo*. La présence de facteurs de croissance tels l'EGF (epithelial growth factor) et le PDGF (platelet-derived growth factor) ou de promoteurs de tumeur comme le 12-O-tétradecanoylphorbol 13-acétate (TPA) diminuent la communication cellulaire entre des cellules de mammifères (Maldonado et col., 1988, Lampe, 1994). Dans plusieurs types de cellules cancéreuses, on observe une diminution de la communication intercellulaire en comparaison avec les cellules normales suggérant ainsi un rôle dans la suppression de tumeur (Zhang et col., 2004, Temme et col., 1997). Dans les cellules tumorales ayant conservé leur capacité à communiquer entre elles, la communication entre les cellules cancéreuses et les cellules normales voisines est fortement perturbée. Dans ce cas, la suppression de la communication entre les cellules tumorales par l'intervention de connexines mutées, dominants négatifs, favorise la prolifération des cellules cancéreuses suggérant à nouveau un rôle des connexines dans le contrôle de la croissance des cellules tumorales (Krutovskikh et col., 1998).

Le mécanisme d'inhibition de la croissance cellulaire par des connexines n'est pas connu. La transfection de gènes de certaines connexines comme la Cx43 et la Cx26 provoque la suppression de la prolifération cellulaire de cellules tumorales (Zhang et col., 1998, Mesnil et col., 1995). La protéine CCN3 est une protéine soluble reconnue pour ses propriétés anti-prolifératives. Une transfection de la Cx43 chez des cellules C6 entraîne une colocalisation de CCN3 avec les plaques de jonctions gap à la membrane cellulaire (Fu et col., 2004). Le gène de la Cx43 peut aussi interagir dans le cycle cellulaire et inhiber la croissance cellulaire de plusieurs lignées cellulaires

tumorales en provoquant la dégradation de la protéine Skp2 responsable de l'ubiquitination de l'inhibiteur protéique p27 (Zhang et col., 2003).

1.3.3. Les jonctions gap et la signalisation intercellulaire

Les jonctions gap permettent la propagation d'un signal d'une cellule excitable à l'autre comme c'est le cas pour les cellules cardiaques. Chez les cellules non excitables, les jonctions gap sont capables de transférer des messagers comme l'AMPc, l'ATP et l'IP₃. L'utilisation de marqueurs de calcium fluorescent a permis d'attribuer aux jonctions gap un rôle plus direct dans la signalisation cellulaire. Les jonctions gap sont capables de propager d'une cellule à l'autre le messager intracellulaire IP₃ qui lui-même induit la libération du Ca²⁺ des saccules du réticulum endoplasmique. Cette élévation de la concentration intracellulaire de calcium se nomme la vague calcique. Cette vague se propage de manière concentrique d'une cellule à l'autre par les jonctions gap et permet donc à des cellules comme les neurones de recevoir et d'intégrer des informations provenant de cellules voisines qu'elle soit du même type cellulaire ou non. Un second mécanisme impliquant l'ATP permet la propagation d'une vague calcique entre des cellules séparées par une zone dépourvue de cellules. La libération de l'ATP dans l'espace extracellulaire se fait toutefois non par les jonctions gap mais par des connexons ou hémicanaux (Vandamme et col., 2004).

1.4. HÉMICANAUX

Les connexons ou «hémicanaux» (HCs) sont formés d'un hexamère de connexines. Après la synthèse et la migration des connexons à travers la voie de sécrétion, ces

derniers se dirigent jusqu'à la membrane plasmique de manière aléatoire. Les connexons présents sur la membrane plasmique sont généralement fermés et leur ouverture se produit de manière ligand-dépendante lorsque deux connexons de chaque cellule entrent en contact (Bennett et col., 2003).

Les HCs ont longtemps été considérés comme étant seulement des précurseurs de jonctions gap. Plusieurs chercheurs ont fait la découverte d'un nombre important de connexons libres sur la membrane plasmique. Un nombre croissant d'études démontre que les connexons peuvent avoir une fonction physiologique propre et posséder des propriétés différentes des jonctions intracellulaires. Une des particularités d'un connexon est que lorsque celui-ci est ouvert, il possède une conductibilité et une perméabilité sélective environ deux fois plus élevée que lorsqu'il forme une jonction (Bennett et col., 2003). Aussi, contrairement aux jonctions gap, les HCs sont en contact direct avec le milieu extracellulaire.

1.4.1. Ouverture des hémicanaux

Les HCs peuvent s'ouvrir dans des conditions d'inhibition métabolique, par application d'un potentiel positif membranaire ou encore lorsque le milieu extracellulaire est pauvre en Ca^{2+} (Saez et col., 2003). Des traitements à la quinine ou quinidine permettent également l'ouverture du connexon alors qu'un milieu extracellulaire concentré en Ca^{2+} , un bas pH intracellulaire et l'utilisation de certains ions tels le Co^{2+} , le Ni^{2+} , le Mg^{2+} , le La^{3+} et le Gd^{3+} participent à la fermeture des connexons. Plusieurs agents bloquants les jonctions gap peuvent être utilisés pour induire la fermeture des HCs comme l'octanol, l'heptanol, le carbenoxolone,

l'oleamide, l'halothane, l'acide 18- α -glycyrrhétinique et l'acide 18- β -glycyrrhétinique (Saez et col., 2003).

Il est également possible de contrôler l'ouverture des connexons par phosphorylation des connexines par différentes protéines kinases. La phosphorylation de la Cx43 par la MAP kinase diminue l'ouverture des HCs de même que la phosphorylation de la Cx46 par la PKC et la caséine kinase 1 (Saez, 2003). La Ser368 de la Cx43 est également la cible de la PKC et serait également responsable de la conductivité des connexons (Bao et col., 2004).

1.4.2. Les rôles des hémicanaux

Le rôle des HCs commence à être exploré principalement au niveau du système nerveux central. Les astrocytes jouent un rôle important dans la réduction de la concentration de glutamate extracellulaire afin d'assurer un environnement adéquat pour la transmission synaptique. Une concentration élevée de glutamate entraîne une sur-excitation nocive pour les cellules neuronales (Ye et col., 2003). En condition pathologique (ischémie) on observe une déphosphorylation de la Cx43 des astrocytes et une diminution du couplage des connexons (Contreras et col., 2002). Lorsque ces cellules sont incubées dans un milieu dépourvu en calcium (niveau pathologique), on observe une nette libération de glutamate via les HCs et une réduction simultanée de la captation de glutamate par les astrocytes *in vitro* et *in situ* (Ye et col., 2003). Dans des conditions physiologiques, une petite proportion de HCs demeure ouverte lorsque la concentration extracellulaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) fluctue (Li et col., 1996). Les HCs pourraient donc influencer l'homéostasie neuronale (Ye et col., 2003, Contreras et col.,

2002). Dans plusieurs types cellulaires une fluctuation de la $[Ca^{2+}]_o$ occasionne un changement dans le volume cellulaire via les HCs. Ce phénomène est en étroite relation avec la croissance et le métabolisme cellulaire (Quist et col., 2000).

Dans les astrocytes, il existe de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs capables d'initier la propagation du calcium. L'élévation intracellulaire de calcium est un événement élémentaire participant à différents processus cellulaires. Les jonctions gap permettent à des messagers comme l' IP_3 de diffuser d'une cellule à l'autre afin de propager le signal calcique aux cellules voisines. Lorsque les cellules ne sont pas en contact, l'ATP relâché par les astrocytes peut initier à distance la vague calcique. L'utilisation d'anticorps capables de lier la partie extracellulaire de la connexine confirme la présence de connexons à la surface des astrocytes (Hofer et Dermietzel, 1998). De plus, une augmentation de l'expression de la connexine occasionne une augmentation de l'activation des récepteurs purinergiques par l'ATP (Cotrina et col., 2000). Les HCs peuvent alors, dans certaines conditions physiologiques, jouer un rôle dans la signalisation cellulaire en permettant la relâche d'ATP qui, de façon paracrine, active les récepteurs purinergiques de cellules avoisinantes (Braet et col., 2003, Hassinger et col., 1996, Stout et col., 2002).

Les HCs peuvent également intervenir dans l'élévation intracellulaire de Ca^{2+} en assurant le passage de NAD^+ dans l'espace extracellulaire. Ce passage à travers la membrane est nécessaire pour permettre à cette molécule d'atteindre l'ectoenzyme CD38 cyclase. Cette enzyme peut alors convertir le NAD^+ en ADP ribose cyclique (cADPR) qui, après diffusion de façon paracrine ou autocrine, sera responsable de la

libération de calcium intracellulaire. Cette mobilisation de Ca^{2+} est responsable entre autre de la libération de glutamate par les astrocytes (Bennett et col, 2003).

1.5. LES CONNEXINES

Les connexines proviennent d'une famille multigénique. Deux nomenclatures peuvent être utilisées pour classer les connexines. Ces protéines sont généralement nommées selon leur poids moléculaire (la connexine 43 possède un poids moléculaire de 43 kDa) mais elles peuvent également être groupées selon la similarité de leur séquence en acide aminés et la longueur de leur segment c-terminal (familles α , β et γ) (Tableau I).

TABLEAU I : NOMENCLATURE DES CONNEXINES.

Nomenclature grecque	Nomenclature selon la masse moléculaire	Masse moléculaire (kDa)	Exemple d'expression dans les organes
α_1	Cx43	43	Cœur
α_2	Cx38	37.8	Embryon
α_3	Cx46	46	Cristallin
α_4	Cx37	37.2	Endothélium
α_5	Cx40	40.6	Poumon
α_6	Cx45	45.5	Cœur
α_7	Cx33	32.9	Testicules
α_8	Cx50	48.2	Cristallin
α_9	Cx60	60	Ovaire
α_{10}	Cx46.6	46.6	Cochlée
β_1	Cx32	32	Foie
β_2	Cx26	26.2	Foie
β_3	Cx31	31	Peau
β_4	Cx31.1	31.1	Peau
β_5	Cx30.3	30.3	Peau
β_6	Cx30.4	30.4	Peau

Puisque la plupart des types cellulaires expriment plus d'un isoforme de connexine, cette similarité rend possible la formation de connexons homomériques (connexons formés d'un type de connexine) et hétéromériques (connexons formés de

plus d'un type de connexine). Cette similarité rend également possible la formation de jonctions gap homotypiques (jonctions formées d'un seul type de connexine) et hétérotypiques (lorsque deux connexons formés chacun de différentes connexines forment une jonction) (Kumar, 1999, Weber et col., 2004). L'oligomérisation de différents types de connexines n'est possible que si la similarité de leur séquence en acide aminés le permet. Par exemple, la Cx43 (α_1) est capable de s'associer avec la Cx45 (α_6) pour former un connexon mais est incapable de former de connexon avec la Cx26 (β_2) (Gemel et col., 2004). La formation de jonctions à partir de plus d'un type de connexine démontre une diversité dans la perméabilité, la conductance et le mode de régulation des jonctions gap (Martinez et col., 2002, Weber et col., 2004).

Il existe un grand nombre de types de connexines réparties dans plusieurs tissus de l'organisme (Tableau I). Chaque jonction est sélective à certaines charges et certaines tailles de molécules. Cette sélectivité assure un fonctionnement adéquat des organes qui les contiennent. La Cx43, la Cx40, la Cx45 et la Cx37 sont toutes les quatre exprimées dans le cœur mais leur patron d'expression distinct assure la régulation de la vitesse de conduction dans différentes régions du cœur (Davis et col., 1996). Les connexines jouent également un rôle important dans la cicatrisation de la peau. L'utilisation de modèles de culture *ex vivo* de peau humaine et porcine, a permis d'observer pendant la cicatrisation une régulation négative de la Cx43 dans les kératinocytes afin de permettre à ces cellules de migrer vers le site de la blessure. Ce phénomène est suivi d'une régulation positive de la Cx26 et la Cx30 aux sites de régénération de l'épiderme (Bradner et col., 2004).

1.5.1. Structure moléculaire des connexines

Les connexines sont formées de quatre domaines trans-membranaires reliés par des ponts disulfure, d'un segment N- et C- terminal cytosoliques, de deux boucles extracellulaires et d'une boucle intracellulaire (Schéma 3). La plupart des connexines conservent une homologie de leurs domaines et présentent des caractéristiques semblables.

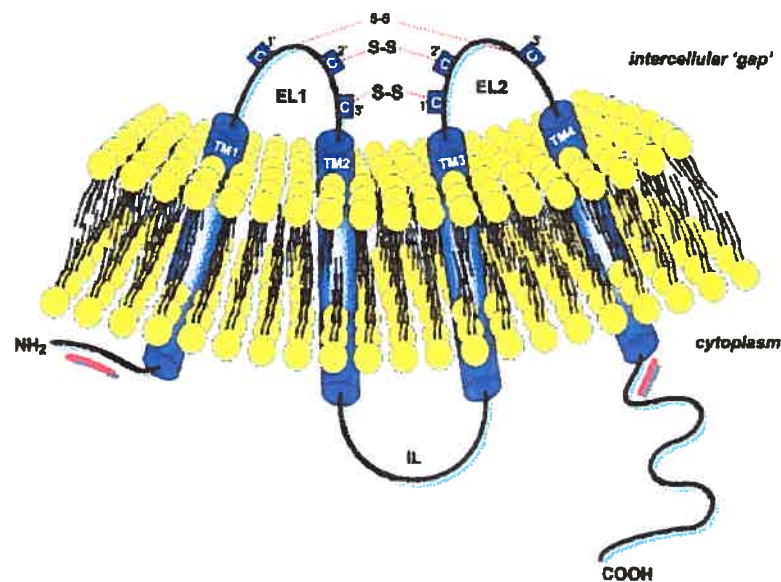


Schéma 3 : Représentation de la structure moléculaire de la connexine. La connexine est formée de quatre domaines trans-membranaires (TM 1-4), de deux boucles extracellulaires (EL 1-2) reliés par des ponts disulfures, d'une boucle intracellulaire (IL), d'un segment N-terminal (NH₂) et C-terminal (COOH) cytosoliques. (Martin, 2004)

Le segment N-terminal contient un site de liaison à la calmoduline nécessaire à l'oligomérisation des connexines (Martin et Evans, 2004). Les domaines trans-membranaires permettent l'ancrage de la connexine à la membrane et contiennent des sites de régulation d'assemblage et de migration vers la membrane plasmique. Les boucles extracellulaires sont très conservées parmi les différentes connexines. Elles

jouent un rôle important dans la reconnaissance et l'assemblage des connexons en jonction et dans leur migration à travers la voie de sécrétion. Les divergences entre les différentes connexines se présentent plutôt au niveau de la boucle intracellulaire et de la portion C-terminale cytosolique des molécules de connexine.

1.5.2. Modifications post-traductionnelles des connexines

La plupart des connexines subissent très tôt dans leur migration à travers la voie de sécrétion des modifications post-traductionnelles telles la phosphorylation. Les protéines kinases peuvent intervenir à différents stades du cycle de vie de la connexine. Ces phosphorylations peuvent déterminer l'assemblage/désassemblage des connexines, l'interaction avec d'autres protéines, la dégradation et la conductivité des jonctions (Lampe et Lau, 2004). L'oligomérisation des connexines en connexons semble une étape nécessaire pour atteindre la membrane plasmique. Par contre, la phosphorylation des connexines n'est pas requise pour leur migration vers la membrane plasmique puisque la Cx26, qui ne contient aucun site de phosphorylation, peut atteindre la membrane sans nécessairement passer par le Golgi (Martin et Evans, 2004). Aucune connexine glycosylée n'a été identifiée jusqu'à ce jour. La présence de ponts disulfure dans la portion extracellulaire du connexon assure son interaction avec le connexon d'une cellule adjacente (Martin et Evans, 2004).

1.5.3. La connexine 43

La Cx43 est la plus répandue des connexines. Elle est présente dans plusieurs organes et tissus comme le système nerveux central, le coeur et le testicule. Comme toutes les connexines, la Cx43 possède 4 domaines trans-membranaires ainsi qu'un segment N-

et C- terminal cytosoliques. Dans la Cx43, le segment C-terminal contient un site de liaison avec la β -tubuline facilitant sa migration à travers la voie de sécrétion. Il existe également un site de liaison avec la protéine de jonction ZO-1 (zonula occludens-1). La ZO-1 agirait possiblement comme recruteur de protéines régulatrices et permettrait une liaison de la Cx43 avec l'actine du cytosquelette (Martin et Evans, 2004).

1.5.4. La phosphorylation de la Cx43

Lorsque l'on observe la migration de la Cx43 sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), la Cx43 présente plusieurs bandes représentant des molécules de Cx43 avec des mobilités électrophorétiques différentes. La bande dont la migration est la plus rapide correspond à la forme non phosphorylée (NP) de la Cx43. Deux autres bandes dont la migration est plus lente correspondent aux formes mono- et di- phosphorylées (1P et 2P) (Lampe et Lau, 2004). Ces deux isoformes migrent à la même vitesse que la NP lorsqu'elles sont soumises à la digestion à la phosphatase alcaline. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation est la première modification covalente détectée par SDS-PAGE.

Il existe de multiples sites de phosphorylation dans la Cx43. En général, les phosphorylations impliquent des sérines mais il existe également des sites de phosphorylation sur des tyrosines. Un nombre croissant de facteurs tels des facteurs de croissance, des promoteurs de tumeur, des protéines kinases oncogènes et des médiateurs de l'inflammation participent à la régulation de la communication intercellulaire par phosphorylation de la région C-terminale de la Cx43 (Warn-Cramer et Lau, 2004).

De nombreuses études démontrent l'impact de la phosphorylation de la Cx43 dans la communication intercellulaire. Des cellules synthétisant la Cx43 mais n'exprimant pas de protéines d'adhésion présentent une absence de la forme 2P et sont incapables de communiquer par des jonctions gap. L'expression exogène de la protéine L-CAM permet dans ces cellules la phosphorylation de la Cx43 (2P) et la conversion en cellules compétentes pour la communication intercellulaire (Musil et col., 1990).

Des variations dans la communication intercellulaire surviennent à différents stades du cycle cellulaire. Pour plusieurs types cellulaires, la phosphorylation de la Cx43 sur la Ser368 par la PKC occasionne une diminution de la communication intercellulaire durant les phases S et G₂/M du cycle cellulaire (Solan et col., 2003). Dans les cellules ovariennes de la granuleuse, une élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc induite par la LH occasionne une augmentation de la phosphorylation de la Cx43 par la PKA et possiblement la PKC. Cette phosphorylation induit une diminution de la communication intercellulaire en réduisant le nombre de jonctions à la membrane plasmique (Granot et Dekel, 1994). L'absence de connexines est souvent à l'origine des tumeurs. Dans les tumeurs induites par des activateurs de la PKC on observe une augmentation de la phosphorylation de la Cx43 et une diminution de la communication entre les cellules (Lampe et Lau, 2004).

La phosphorylation peut également intervenir dans la stabilité de la Cx43. Dans des cellules épithéliales du cristallin, la phosphorylation déstabilise la Cx43 et

diminue sa demi-vie par dégradation via le protéasome (Warn-Cramer et Lau, 2004). La PKC est reconnue pour phosphoryler la Ser368 et la Ser372 *in vitro* et majoritairement la Ser368 *in vivo* (Lampe et Lau, 2000, Lampe et col., 2000). Dans des cellules stimulées par l'agent promoteur de tumeur TPA, un stimulateur de la PKC, on observe une diminution de la conductance des jonctions et une augmentation du taux de dégradation de la Cx43 (Lampe et Lau, 2000). À l'inverse, l'utilisation d'inhibiteurs de protéasome prolonge la demie-vie de la Cx43 (Laing et col., 1997). Il est donc possible de moduler la communication intercellulaire en contrôlant la dégradation de la connexine.

1.6. LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES

Les cytokines correspondent à une famille de molécules polypeptidiques solubles de faible masse moléculaire. Elles sont produites par de nombreuses cellules en réponse à une infection, une lésion ou une inflammation et peuvent agir sur de très nombreuses cellules cibles. La majorité des cytokines ont une durée de vie très brève et agissent essentiellement localement de manière paracrine ou autocrine mais il existe aussi des cytokines capables d'agir à distance selon un mode endocrine. On compte plusieurs classes de cytokines 1) les interleukines; 2) les interférons; 3) les chemokines; 4) les facteurs de croissance hematopoïétiques et 5) les «tumors necrosis factors». De nombreuses cytokines démontrent une redondance dans leur activité biologique et leur action s'exerce via des réactions en chaîne qui entraînent une amplification du signal. Les cytokines pro-inflammatoires tels l'IL-1 β et le TNF α sont exprimées essentiellement par les cellules du système immunitaire en réponse à une lésion ou à une infection afin d'induire une réponse inflammatoire. De nombreuses lésions

tissulaires chroniques telles que la maladie de Crohn, l'ostéoporose, la polyarthrite rhumatoïde et certaines maladies neuro-dégénératives (Tomita et col., 2001, Reimold, 2002) sont causées par une réponse inflammatoire excessive, déclenchée par la surexpression de cytokines pro-inflammatoires.

Il est maintenant reconnu que le système neuroendocrinien et le système immunitaire sont en étroite relation. Les récepteurs à cytokines sont largement exprimés dans l'hypophyse antérieure (Benigni et col., 1996, Cunningham et col., 1992, Wang et col., 1996) et la presque totalité des cytokines pro-inflammatoires induisent une stimulation de l'axe hypothalamo-adénohypophysaire (Kariagina et col., 2004). La lignée cellulaire folliculostellaire TtT/GF exprime à la membrane plasmique le récepteur TNFR1 et l'exposition de ces cellules au $\text{TNF}\alpha$ occasionne la libération d'IL-6 (Kobayashi H et col., 1997). L'induction des cellules FS à l'IL-1 β permet également la sécrétion d'IL-6 et de follistatine (Bilezikjian et col., 2003). Les cytokines IL-1 β et $\text{TNF}\alpha$ sont exprimées dans l'hypophyse antérieure et jouent un rôle non seulement dans la réponse immunitaire mais également dans la régulation du développement, de la prolifération cellulaire et du contrôle de la sécrétion hormonale de cette glande.

1.6.1. Signalisation de la réponse inflammatoire

L'IL-1 β et le $\text{TNF}\alpha$ sont des activateurs importants du facteur de transcription NF κ B durant la réponse inflammatoire. NF κ B est un facteur nucléaire formé des deux sous-unités : p50 et p65. Sous sa forme inactive, NF κ B s'accumule dans le cytoplasme et est lié à la protéine inhibitrice I κ B. L'activation de la voie de signalisation produit la

phosphorylation de l'inhibiteur I κ B et provoque ensuite sa séparation avec NF κ B, son ubiquitination et sa dégradation par la voie des protéasomes. La libération et l'activation de NF κ B sont suivies de sa translocation au noyau et de la transcription de gènes impliqués dans le processus d'inflammation et de la survie cellulaire (Schéma 4).

La cytokine TNF α est une molécule homotrimérique qui peut s'associer à deux différents récepteurs : TNFR1 et TNFR2. TNFR2 contient un motif d'interaction avec les protéines TRAFs (TNF receptor-associated factors) sur sa queue cytoplasmique. L'activation de TNFR2 permet le recrutement de protéines de la famille des TRAFs et active plusieurs voies de signalisation dont celle de NF κ B. TNFR1 est un récepteur contenant un domaine de mort (death domain) sur sa queue cytoplasmique. L'activation de TNFR1 permet le recrutement de protéines adaptatrices capables d'activer la cascade des caspases responsable de l'apoptose. De plus, TNFR1 est également capable, grâce à sa protéine adaptatrice TRADD (TNF receptor-associated death domain) d'interagir avec les protéines TRAFs (Dempsey et col. 2003). Ces deux récepteurs permettent donc la libération de NF κ B mais le récepteur TNFR1 constitue le récepteur majeur d'activation. Les récepteurs TNF sont homotrimériques et l'interaction des récepteurs est nécessaire pour leur association avec la molécule TNF α . Lors de la liaison ligand récepteur, les protéines de la famille des TRAFs ou RIP (Receptor-interacting protein) s'associent au récepteur et provoquent une succession de phosphorylations permettant la phosphorylation de la MAP3K, une kinase sérine spécifique comprenant NIK (NF κ B-inducing kinase). L'activation de NF κ B se fait par l'intermédiaire du complexe IKK (I κ B kinase) (Li et col., 1999).

L'IL-1 β peut également s'associer à deux types de récepteurs sur la membrane plasmique. Les récepteurs IL-1R1 et IL-1R2 sont tous deux capables de se lier avec le récepteur accessoire « IL-1 receptor accessory protein » (IL-1RAcP) mais seul le IL-1R1 est capable de transmettre le signal (Auron, 1998, Lang et col., 1998). La liaison ligand-récepteur induit l'association avec la protéine accessoire et permet la liaison avec TRAF6 et la kinase « IL-1 receptor associated kinase » (IRAK). Le mécanisme de phosphorylation de I κ B n'est pas entièrement élucidé mais il semble que la kinase NIK est activée par une cascade de phosphorylations induites par des kinases activées par TRAF2 ou TRAF6 pour interagir avec le complexe IKK responsable de la phosphorylation de I κ B et la libération de NF κ B (Ninomiya-Tsuji et col., 1999) (Schéma 4).

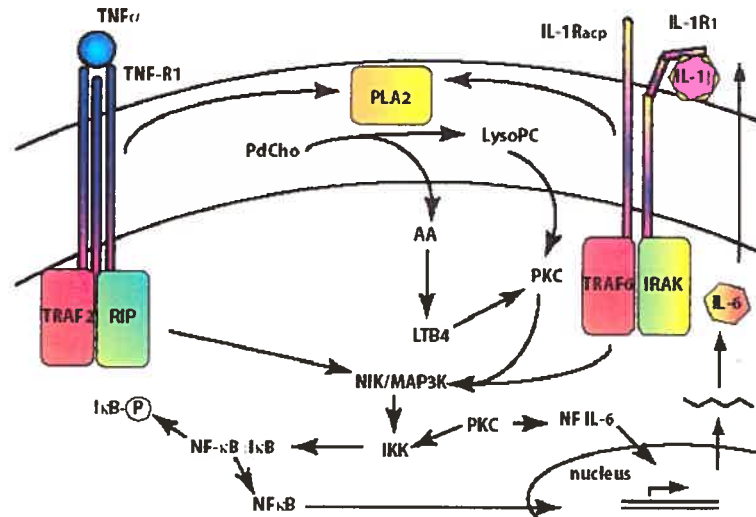


Schéma 4 : Voies de signalisation induites par les cytokines TNF α et IL-1 β suite à une inflammation.

Il existe aussi d'autres voies de signalisation pouvant conduire à l'activation de NFκB. L'une d'entre elles implique la phospholipase A2 (PLA₂). Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα et l'IL-1β peuvent moduler l'expression de la smpPLA₂ du groupe IIa. Cette PLA₂ est une enzyme impliquée dans la libération de AA (acide arachidique) dans des conditions d'inflammation (Anthonsen et col., 2001). L'activité de la phospholipase A2 permet la mobilisation de leukotriène B4 (LTB₄) et l'activation d'une cascade de kinases incluant la PKC λ/ι et p38 conduisant à la phosphorylation et la dégradation de IκB par le complexe IKK et à la libération de NFκB (Schéma 4).

1.6.2. Les cytokines pro-inflammatoires et la communication intercellulaire

Les cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNFα peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la communication intercellulaire par les jonctions gap. Les effets engendrés par ces cytokines dépendent du type cellulaire. Dans les astrocytes, l'IL-1β augmente l'activité inhibitrice de l'ATP sur la communication intercellulaire. L'ATP étant massivement relâché lors de lésions du cerveau ou lors d'inflammation, la diminution de la communication par les jonctions pourrait jouer un rôle protecteur chez les astrocytes (Meme, 2004). L'IL-β a la capacité de provoquer la dégradation du cartilage et d'induire l'arthrite. Dans les chondrocytes, l'IL-1β stimule la synthèse de la Cx43 et augmente la concentration intracellulaire de Ca²⁺. Cette activation se potentialise par la transmission de Ca²⁺ à travers les jonctions (Tonon et D'Andrea, 2002). Au niveau des cellules cardiaques, la présence de TNFα est capable de diminuer l'activité du promoteur de la Cx43. L'inflammation provoquerait une diminution de l'expression de la Cx43 et donc de la communication intercellulaire au

niveau du cœur et serait responsable de dysfonctions cardiaques (Fernandez-Cobo et col., 1999).

7. HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Les cellules FS expriment la Cx43 et sont reliées entre elles par des jonctions gap, formant ainsi un réseau dans l'hypophyse antérieure. Les cellules FS sont la cible de protéines modulatrices comme les hormones et les cytokines et sont reconnues pour sécréter un grand nombre de cytokines. Il existe une étroite relation entre le système immunitaire et le système endocrinien (Turnbull et Rivier, 1999). Notre laboratoire a démontré que durant le cycle annuel reproductif du vison, il existait une relation entre la sécrétion de prolactine par les cellules lactotropes et l'expression de la Cx43 dans l'hypophyse antérieure (Vitale et col., 2001). Notre hypothèse est que les jonctions gap à l'intérieur du réseau de cellules FS permettrait une synchronisation rapide de la régulation des cellules endocrines. Si des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF α étaient capables de moduler l'expression et la localisation de la Cx43 dans les cellules FS, cette modulation pourrait avoir une incidence sur la communication intercellulaire entre les cellules FS. Ainsi, la communication entre les cellules FS pourrait jouer un rôle clé dans la coordination de la sécrétion hormonale de l'hypophyse antérieure.

Dans la présente étude nous avons étudié si les cytokines IL-1 β et TNF α pouvaient moduler l'expression et la localisation de la Cx43 dans les cellules TtT/GF. Pour ce faire, nous avons utilisé trois anticorps capables de reconnaître respectivement les formes non phosphorylée et phosphorylées de la Cx43 (Pan-Cx43), la forme non

phosphorylée en sérine 368 (NP-Cx43) et la forme phosphorylée de la sérine 368 (P-Cx43). La première étape de l'étude a consisté à localiser la Cx43 et ses différents états de phosphorylation dans les cellules TtT/GF par immunobuvardage et par immunofluorescence. Nous avons ensuite étudié l'influence des facteurs sériques sur l'expression et la localisation de la Cx43. La microscopie confocale a également été utilisée pour préciser l'association de la Cx43 avec des organites de la cellule. Les cellules ont ensuite été traitées avec les cytokines IL-1 β et TNF α et soumises à des études en immunobuvardage et en immunofluorescence afin d'étudier l'effet de ces cytokines pro-inflammatoire sur l'expression et la localisation des formes non phosphorylée en sérine 368 (NP-Cx43) et phosphorylée en sérine 368 (P-Cx43) de la Cx43. Puisque la demie-vie de la Cx43 peut avoir une influence directe sur la communication intercellulaire, des substances capables d'inhiber la synthèse ou la dégradation de la Cx43 ont été utilisées afin de connaître l'implication des voies de dégradation de la Cx43 dans des cellules TtT/GF traitées à l'IL-1 β et au TNF α . Nous avons ensuite vérifié l'impact de ces cytokines sur la communication entre les cellules TtT/GF par diffusion d'un colorant incapable de traverser la membrane plasmique mais suffisamment petit pour traverser les jonctions gap lorsqu'elles sont ouvertes. Enfin, sur des hypophyses antérieures de vison, nous avons étudié l'influence des variations hormonales survenant au cours du cycle reproductif du vison mâle sur l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43.

Nos résultats ont démontré que la phosphorylation de la sérine 368 de la Cx43 n'est pas essentielle à la translocation de la protéine vers la membrane plasmique. La phosphorylation de la sérine 368 se produit lorsque la Cx43 se retrouve à la membrane

plasmique. L'IL-1 β et le TNF α sont capables de moduler l'expression et la localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF. Le traitement avec l'IL-1 β et le TNF α entraîne une augmentation de l'association de la NP-Cx43 avec les lysosomes. Le traitement des cellules avec ces cytokines et particulièrement avec l'IL-1 β provoque également une augmentation de la présence de la Cx43 phosphorylée en sérine 368 à la membrane plasmique et une augmentation de la communication intercellulaire. Nos études sur l'impact du cycle reproductif du vison mâle sur l'expression des formes phosphorylée et non phosphorylée en sérine 368 de la Cx43 ont également démontré qu'il existe une modulation de l'expression de la Cx43 tout au long du cycle.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Anticorps

L'anticorps monoclonal contre la Cx43 (13-8300) de la souris (*Zymed*, San Francisco, CA, É-U) reconnaît la forme non phosphorylée en sérine 368 de la connexine 43 (NP-Cx43). L'anticorps polyclonal du lapin contre la Cx43 phosphorylée en Ser 368 (P-Cx43) est fourni par *Chemicon International* (Temecula, CA, É-U). L'anticorps Cx43 polyclonal provenant du lapin reconnaissant toutes les formes de la Cx43 (PanCx43) provient de *Sigma* (St Louis MO, É-U). La lectine WGA (*Molecular Probes*, Eugene, OR, É-U) reconnaît l'appareil de Golgi en entier. L'anticorps monoclonal GM130 de la souris (*Bio/Can Scientific*, Mississauga, ON, Canada) et l'anticorps TGN38 provenant du mouton (*Serotec*, Kidlington, Oxford, R-U) reconnaissent respectivement le Golgi *cis* et le Golgi *trans*. L'anticorps polyclonal chez le lapin contre la calnexine (*Calbiochem*, Californie, É-U) sert de marqueur de réticulum endoplasmique rugueux et l'anticorps polyclonal lamp-1 provenant du rat (*Université de Iowa*, Iowa, É-U) est un marqueur de lysosomes. Les anticorps secondaires couplés à la fluorescéine (FITC), à la rodhamine (TRITC) et à la peroxidase (HRP) contre les IgG de souris, rat, mouton et lapin sont fournis par *Bio/Can* (Mississauga, ON, Canada).

2.2. Drogues, cytokines et produits chimiques

La cycloheximide a été achetée chez *Sigma* (St-Louis, MO, É-U). La calcéine est fourni par *Molecular Probes* (Eugene, OR, É-U). La leupeptine et la lactacystine sont fournis par *Sigma* (St-Louis, MO, É-U). Le sérum d'âne est fourni par *Bio/Can* (Mississauga, ON, Canada). L'IL-1 β est fourni par *Sigma* (St Louis, MO, É-U) et le

TNF α par *Roche Molecular Biochemicals* (Laval, Qc). La trypsine est fourni par *Roche* (Laval, Canada) et l'inhibiteur de trypsine est fournis par *Sigma* (St-Louis, MO, É-U).

2.3. Hypophyse antérieure de vison

Chez le vison, il existe un cycle annuel de reproduction durant lequel des variations dans la sécrétion d'hormones hypophysaires surviennent. Des recherches antérieures de notre laboratoire nous ont permis d'étudier la relation entre l'expression de la Cx43 et la variation de la sécrétion de prolactine à l'intérieure du cycle reproductif du vison (Vitale et col., 2001). D'autres chercheurs ont étudié les variations dans la sécrétion de GnRH et la production de testostérone pendant le cycle annuel de reproduction du vison mâle (Caillol et col., 1995). L'étude a démontré que la sécrétion basale de GnRH augmentait progressivement à partir du mois de mai puis significativement entre le mois de septembre et le mois d'octobre pour atteindre un pic en novembre. La sécrétion basale de GnRH baisse ensuite drastiquement à partir de décembre pour atteindre un minimum en février. Il serait alors intéressant de vérifier le niveau d'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans l'hypophyse antérieure chez certains mois du cycle de reproduction du vison notamment les mois de février, mai et août.

2.3.1. Préparation des hypophyses antérieures de vison

À la dernière semaine de chaque mois, notre laboratoire s'est procuré des visons des fermes Armand Richard Visonnière (St-Damase, Québec), Fourrures Mario Boutin Inc. (Deauville, Québec) et RBR Fur Farm (St-Thomas, Ontario). Les visons ont été anesthésiés à l'aide d'une injection de Somnotol (pentobarbital sodique 0.2ml/kg)

(Cambridge, ON, Canada). Les hypophyses antérieures de vison mâles adultes sont recueillies sur place dans un tampon PBS contenant de l'inhibiteur de protéases (2 mM de phényl-méthyl-sulfonyl-fluoride (PMSF)). Les hypophyses sont ensuite homogénéisées par sonication dans un tampon PBS avec inhibiteur de phosphatases et de protéases (10µM bpV phen, 4mM Na₃VO₄, 80mM NaF, 20mM Na₄P₂O₇, 2mM EGTA, 5µg/ml leupeptine, 5µg/ml aprotinin, 2mM PMSF) puis entreposés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.4. Culture cellulaire

La lignée cellulaire TtT/GF provient d'une tumeur de cellules thyrotropes de l'hypophyse antérieure de souris induite par radiothyroïdectomie (Inoue et col., 1992). Cette tumeur, une fois transplantée, formait des lobules dont la surface était recouverte de cellules non endocrines de forme étoilée qui possédaient de longs prolongements. Ces cellules possédaient des lysosomes ainsi qu'une activité phagocytaire. Elles étaient également marquées positivement avec l'anticorps contre la protéine S-100, un marqueur spécifique des cellules folliculostellaires et étaient aussi contre la protéine GFAP (glial fibrillary acidic protein), un marqueur spécifique de cellules gliales et qui n'est exprimé dans l'hypophyse antérieure que dans les cellules folliculostellaires (FS).

Plusieurs modèles tels la purification des cellules FS par gradient de densité ou l'utilisation de cultures primaires de cellules FS ont été utilisés pour évaluer le rôle des cellules FS au sein de l'hypophyse antérieure. Ces modèles étaient très utiles mais ils ne permettaient pas d'obtenir une quantité suffisante de cellules ni d'utiliser des échantillons purs de cellules FS. L'emploi de la lignée cellulaire TtT/GF est une

méthode *in vitro* permettant d'étudier avec plus d'exactitude la fonction des cellules FS puisqu'elle procure l'avantage d'utiliser des fractions pures.

Les cellules TtT/GF nous ont été données par le Dr Ulrich Renner de l'institut Max-Planck, Munich d'Allemagne. Les cellules TtT/GF sont mises en culture dans un incubateur à une température de 37°C, sous une atmosphère 5% CO₂-95% air dans un milieu de culture complet Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (*Gibco-Life technologies*, Burlington, ON, Canada) d'un pH de 7,2 auquel est ajouté 10 mM d'HEPES, 0.1 M de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) (*Sigma*, St-Louis, MO, É-U), 0.2mg/ml de pénicilline, 0.05mg/ml de streptomycine et 5% de sérum de fœtus bovin (FCS) (*Gibco-Life technologies*, Burlington, ON, Canada).

2.5. Préparation des fractions membranaires et cytosoliques

Les cellules TtT/GF sont grattées puis centrifugées à 1500 x g (Beckman GS-6R; Beckman Canada, Mississauga, ON, Canada) pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé et centrifugé 2 fois avec du PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Le culot est ensuite suspendu dans une solution d'inhibiteur de protéase et de phosphatase avant d'être homogénéisé par sonication. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 1500 x g (Beckman GS-6R; Beckman Canada, Mississauga, ON, Canada) pendant 10 minutes à 4°C pour extraire les noyaux et les débris cellulaires. Le surnageant est centrifugé à 15 000 x g pendant 20 min (Beckman microfuge E) à 4°C. Le culot est suspendu à nouveau dans la solution d'inhibiteur de phosphatase et de protéase et constitue la fraction enrichie en membrane. La fraction enrichie en cytosol constitue le surnageant.

2.6. Préparation des fractions subcellulaires des cellules TtT/GF

La préparation des fractions subcellulaires de cellules TtT/GF comprend plusieurs étapes de centrifugation figurant dans le protocole décrit initialement par De Duve et col. et Wattiaux et col. (De Duve et col., 1955, Wattiaux et col., 1978). Les cellules TtT/GF sont décollées à la trypsine et mises en culture dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre dans du milieu d'incubation contenant 5% de FCS (foetal calf serum) dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂-95% air. Deux jours plus tard, le milieu des cellules est remplacé par du milieu frais contenant 5% de FCS. Après avoir obtenu une confluence de 90-100%, les cellules sont séparées à l'aide d'un grattoir puis récupérées par centrifugation à 1500 x g (Beckman GS-6R rotor GH 3.8; Beckman Canada, Mississauga, ON, Canada) pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est suspendu dans du PBS 1x et centrifugé à 1500 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est ensuite suspendu dans un tampon de saccharose (0.25 M saccharose, 4 mM imidazole pH 7.4, 1 mM PMSF) puis les cellules sont brisées par passage successif dans des aiguilles de diamètre de plus en plus petit. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1000 x g pendant 10 minutes à 4°C (Beckman GS-6R, rotor GH 3.8). Le surnageant est conservé (S1) et le culot est suspendu dans le tampon de saccharose et centrifugé à 1000 x g une seconde (S2) puis une troisième fois (S3). Pour séparer les mitochondries lourdes, les trois surnageants recueillis (S1,S2,S3) sont centrifugés à 3000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot constitue les mitochondries lourdes. (voir Schéma)

Les surnageants S1 à S3 sont ensuite centrifugés à 33 000 x g pendant 10 minutes (Beckman ultracentrifuge XL-70, rotor 50Ti) à 4°C. Le culot constitue la

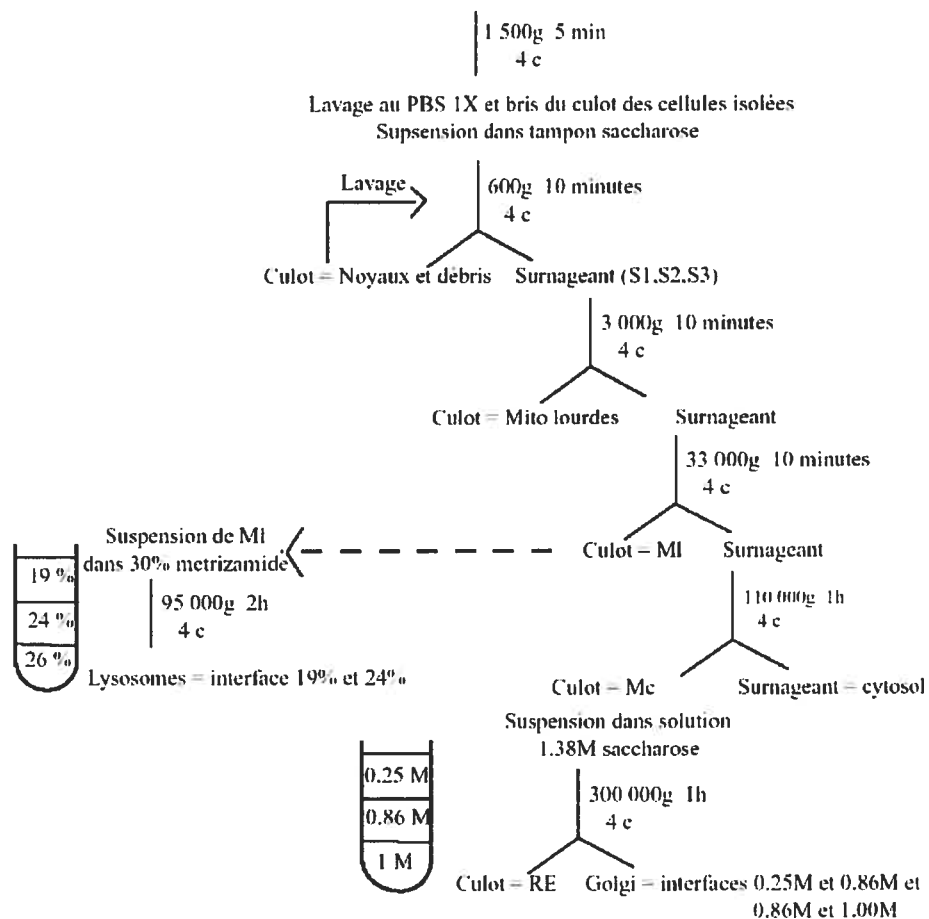
fraction des mitochondries légères (Ml) et contient les lysosomes. Le surnageant est centrifugé à $110\,000 \times g$ pendant 1 heure (Beckman ultracentrifuge XL-70, rotor SW60) à 4°C . Le culot constitue la fraction contenant les microsomes (Mc) et le surnageant est considéré comme le cytosol.

Le culot Ml est suspendu dans une solution de métrizamide de 30% et est déposé au fond d'un gradient discontinue de métrizamide de 26%, 24% et 19%. Après centrifugation de 2h à $95\,000 \times g$ (Beckman ultracentrifuge XL-70 et rotor SW60) à 4°C , les lysosomes sont recueillis sur l'interface 19 et 24% de métrizamide et suspendu dans un volume équivalent de tampon saccharose.

Le culot Mc est suspendu dans un tampon saccharose jusqu'à une concentration finale de 1.38 M et est placé sous un gradient discontinue de saccharose 0.25M, 0.86M et 1.0M. Après une centrifugation de $300\,000 \times g$ pendant 1h (Beckman ultracentrifuge XL-70, rotor SW60) à 4°C , la fraction golgienne est recueillie aux interfaces 0.25M et 0.86M et 0.86M et 1.00M et le culot constitue la fraction de réticulum endoplasmique rugueux (voir schéma).

Fractionnement sub-cellulaire des cellules TfT/GF

Cellules en TfT/GF en culture
décolées à la trypsine



2.7. Immunofluorescence

2.7.1. Préparation des cellules TtT/GF

Les cellules sont mises en culture sur lamelles dans des boîtes de Pétri de 35mm dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂-95% air. Après une incubation de 2 jours, les cellules sont incubées dans un milieu de culture frais en présence ou en absence de sérum. Deux jours plus tard, les cellules sont exposées à différentes cytokines (IL-1 β ou TNF α) ou drogues (cycloheximide, leupeptine, lactamycine) et ceci pour différents temps d'incubation selon un protocole spécifique.

2.7.2. Fixation/Perméabilisation

Les cellules sont fixées et perméabilisées selon deux méthodes :

Méthode 1 : Fixation à la formaldéhyde et perméabilisation à l'acétone.

Les cellules sont fixées à la formaldéhyde 3.7% dans du tampon phosphate PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Après plusieurs lavages des lamelles dans du PBS, les cellules sont imperméabilisées 5 minutes à l'acétone 50% (dilué dans de l'eau) , 5 minutes à l'acétone 100% et 5 minutes à l'acétone 50%.

Méthode 2 : Fixation/perméabilisation au méthanol.

Les cellules sont fixées et perméabilisées au méthanol -20°C pendant une période de 10 minutes.

2.7.3. Blocage des cellules et incubation avec les anticorps

Pour les deux méthodes les cellules sont rincées au PBS avant de subir un blocage dans du lait écrémé 3% dilué dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec les premiers anticorps dilués dans du lait 1 % dans du PBS pendant 1h30 à 37°C. Après plusieurs lavages des cellules dans du PBS, une incubation des cellules pendant 1 heure à 37°C est effectuée avec les seconds anticorps dilués dans du lait 1%.

Certains anticorps ont nécessité un protocole différent de blocage et d'incubation. Dans ce cas-ci, un blocage est effectué dans 5% de sérum d'âne pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées dans le premier anticorps 1h30 à 37°C dans 5% de sérum d'âne. Le second anticorps est dilué dans du PBS seul et les cellules sont incubés 1h à 37°C dans cette solution.

Les anticorps utilisés en microscopie à fluorescence sont les anticorps contre la NP-Cx43 (dilution 1 : 20), la P-Cx43 (dilution 1 : 40) la Pan-Cx43 (1 : 3000), contre la calnexine (1 : 250), lamp-1 (1 : 150) et GM130 (dilution 1 : 20). Également la lectine WGA (dilution 1 : 250) a été utilisée en microscopie à fluorescence.

La visualisation des cellules est effectuée au microscope à fluorescence Zeiss Axioskop 2 ou encore au microscope confocal Zeiss Axiovert.

2.8. Expression de la Pan-Cx43 chez les cellules TtT/GF en absence ou en présence de sérum

Les cellules TtT/GF sont déposées sur des lamelles de verre dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre dans un milieu d'incubation contenant 5% FCS. Deux jours plus tard, le milieu des cellules est remplacé par du milieu frais avec ou sans sérum. Deux jours plus tard, après l'obtention d'une confluence des cellules de 90-100%, les cellules sont préparées pour la microscopie à fluorescence.

2.9. Expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 après incubation avec des cytokines pro-inflammatoires

Les cellules TtT/GF sont déposées sur des lamelles de verre dans des boîtes de Pétri d'un diamètre de 35 mm dans un milieu d'incubation contenant 5% de FCS. Deux jours plus tard, le milieu des cellules est remplacé par du milieu frais contenant 5% de FCS. Deux jours plus tard, après l'obtention d'une confluence de 90-100%, les cellules sont exposées à 10ng/ml d'IL-1 β ou 25 à 50 ng/ml de TNF α à des périodes de 0 (contrôle), 1h, 2h, 6h et 24h. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence.

2.10. Effet de l'inhibition de la synthèse de protéines sur l'induction de la NP-Cx43 et la P-Cx43 par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α

Les cellules TtT/GF sont déposées sur des lamelles de verre dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre dans un milieu d'incubation contenant 5% de FCS. Deux jours plus tard, le milieu des cellules est remplacé par du milieu frais contenant 5% de FCS. Deux jours plus tard, après l'obtention d'une confluence de 90-100%, les cellules sont incubées en présence de cycloheximide (CHX) (dilué dans du DMSO) pendant 30

minutes avant l'ajout de 10ng/ml d'IL-1 β ou de 25 ng/ml de TNF α à des périodes de 0 (contrôle) et 2 heures. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence.

2.11. Effet de l'inhibition de la voie de dégradation par les lysosomes ou les protéasomes sur l'induction de la NP-Cx43 et la P-Cx43 par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α

Les cellules sont déposées sur des lamelles de verres dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre dans du milieu contenant 5% FCS. Deux jours plus tard, le milieu des cellules est remplacé par du milieu frais contenant 5% FCS. 48 heures plus tard, les cellules sont exposées pendant 30 minutes à 100 μ M de leupeptine (dilué dans du PBS) ou à 15 μ M de lactacystine (dilué dans du milieu d'incubation) avant l'ajout de 10ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/ml de TNF α à des périodes de 0 (contrôle) et 2 heures. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence.

2.12. Mesure de la communication intercellulaire par absorption de colorant

Les cellules sont digérées et déposées sur des lamelles de verres dans des boîtes de Pétri de 35 mm avec du milieu contenant 5% FCS. Deux jours plus tard, le milieu des cellules est remplacé par du milieu frais contenant 5% FCS. Après obtention d'une confluence de 90-100%, les cellules sont rincées plusieurs fois avec du milieu d'incubation sans sérum d'un pH de 8.0. Trois sillons parallèles sont ensuite gravés sur la lamelle et 0.5 mM de calcéine sont ajoutés au milieu pendant une période de 15 minutes à 4°C. Les cellules sont fixées à la formaldéhyde 3.7% et les résultats sont observés au microscope à fluorescence.

2.13. Western blot

2.13.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976). Une quantité connue de BSA est mesurée par les réactifs fournis par Bio-Rad (*Bio-Rad*, ON, Canada) afin d'effectuer une courbe d'étalonnage. La quantité de protéines totales des échantillons est calculée d'après cette courbe standard. Les échantillons sont ensuite dilués dans un tampon d'échantillon 2X (8M Urée, 3% SDS, 5% mercaptoéthanol, 0.005% bleu de bromophénol, 70mM Tris HCl pH 6.7) et chauffé à l'eau bouillant pendant 2 minutes.

2.13.2. Électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE

De 5 à 15µg de protéines totales sont largués pour effectuer une migration dans un gel de polyacrylamide d'entassement de 4% (70mM Tris-HCl pH 6.7, 0.4% SDS, 4mM EDTA pH 6.7, 5% glycérol 4 % acrylamide) puis dans un gel de polyacrylamide d'espacement de 12% (0.2M Tris-0,1M Glycine, 0.4% SDS, 5% glycérol, 12 % acrylamide). La migration est effectuée à un voltage de 70 volts pendant 30 minutes suivit d'un voltage de 120 volts pendant 2 heures 30 minutes dans un tampon d'électrode 2x (0,2M Tris, 0,3M glycine, 0.2% SDS).

2.13.3. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide à une membrane de nitrocellulose de pores de 45µm. Le transfert est effectué dans un tampon de transfert (25 mM Tris-base pH 8.3, 150mM Glycine, 20% méthanol) à une température de 4 °C

pendant une période de 1.2 heures à 300 mA. Les protéines sont ensuite révélées au rouge de ponceau (0.2% rouge de ponceau, 3% TCA) pour évaluer la qualité du transfert et déterminer le poids moléculaire des protéines à l'aide d'un poids moléculaire standard élevé (*Bio-Rad*, ON, Canada). Les membranes sont alors rincées au PBS 1x pour éliminer la coloration.

2.13.4. Immunobuvardage des membranes

La saturation des membranes est effectuée avec du lait 5% dans du PBS 1h à 37°C. La membrane est ensuite mise en contact avec l'anticorps primaire dilué dans du lait 5% ou du BSA 5% dans du PBS 2h à 37°C ou toute la nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée 4 fois 10 minutes avec du PBS 0.05% Tween-20 (PBST) à 37°C puis mise en contact avec le deuxième anticorps couplée à la peroxidase (POD) dilué dans du PBS pendant 1h à température pièce. La membrane est rincée trois fois 10 minutes au PBST et une fois au TBS 1x pendant 10 minutes.

Les anticorps contre la NP-Cx43 (dilution 1 : 200), la PanCx43 (1 : 7000), contre la calnexine (1 : 2500) et lamp-1 (1 : 1000) sont dilués dans du lait 5%-PBS. L'anticorps contre la Cx43P (1 : 400) est dilué dans du 5% BSA dilué dans du PBS.

2.13.5. Révélation des protéines sur la membrane par cheluminescence

La révélation du complexe anticorps-antigène s'est réalisée avec les solutions de chimiluminescence fournies par Roche Molecular Biochemicals (Lumi light plus Western blotting substrate ou BM cheluminescence blotting substrate (POD)). La

lumière émise suite à la réaction de la peroxidase est captée sur film Kodak X-OMAT XAR-5 (Eastman Kodak, Rochester, NY).

2.14. Quantification des bandes obtenues par Western blot

La quantification des bandes obtenue par western blot est calculée afin d'évaluer la quantité relative de protéines des échantillons analysés. Les films ont été numérisés (scanner Astra 1200S; Umax Data Systeem Inc Hsinchu, Taiwan, ROC) en utilisant le programme VistaScan32. Le programme Scion Image Software (Scion Corporation, MD, É-U) a été utilisé pour mesurer l'intensité relative des bandes concernées (suivant les indications du programme). La mesure de l'intensité relative des bandes s'est faite au minimum sur trois expériences. Les valeurs obtenues sont exprimées en unités arbitraires et les calculs statistiques sont effectués avec le programme Sigma Plot 2001. Les résultats sont présentés sous forme graphique et exprimés en moyenne \pm SEM (standard error of the mean).

3. RÉSULTATS

3.1. LOCALISATION ET EXPRESSION DE LA Cx43 DANS LES CELLULES TtT/GF

A) Localisation des formes non phosphorylée, mono- et di- phosphorylées de la connexine 43 dans les cellules TtT/GF en culture

Nous avons observé la localisation de la Cx43 différenciellement phosphorylée dans les cellules TtT/GF à l'aide de différents anticorps. Pour ce faire, nous avons incubé des cellules TtT/GF dans un milieu de culture contenant 5 % de sérum et nous avons préparé les cellules pour l'immunobuvardage et la microscopie à fluorescence. La figure 1A montre la présence des 3 isoformes électrophorétiques en immunobuvardage sur des fractions membranaire (Mb) et cytosolique (Cl) de cellules TtT/GF lorsqu'on utilise l'anticorps qui détecte toutes les formes de la Cx43 (anti-Pan-Cx43). La bande ayant migrée le plus rapidement correspond à la forme non-phosphorylée de la Cx43 (Figure 1A, NP). Le doublet de bandes situé au dessus de la bande NP représente les formes mono- (1P) et di- (2P) phosphorylées de la Cx43. La figure 1B montre en immunofluorescence la distribution des formes non phosphorylée, et phosphorylées de la Cx43. Si on utilise l'anticorps qui détecte toutes les formes phosphorylées et non phosphorylée de la Cx43 (Pan-Cx43), on peut distinguer un marquage sur la membrane plasmique particulièrement lorsque les cellules sont en contact (figure 1B, flèche). On peut également distinguer un marquage dans la région périnucléaire de la cellule (figure 1B, tête de flèche). La figure 1C montre la localisation de la Cx43 non phosphorylée à la sérine 368 (NP-Cx43). On remarque que la majorité du marquage se situe dans la région périnucléaire (figure 1C, tête de flèche) mais qu'il existe

également un marquage à la membrane plasmique lorsque les cellules sont ou ne sont pas en contact entre elles (figure 1C, flèches). Enfin, la figure 1D montre les cellules TtT/GF marquées avec un autre anticorps qui détecte la Cx43 phosphorylée en sérine 368 (P-Cx43). Le marquage de la P-Cx43 se situe presque exclusivement à la membrane plasmique mais on peut également distinguer du marquage à l'intérieur de la cellule. Le marquage sur la membrane plasmique se situe aux contacts cellulaires et également à des régions de la membrane où la cellule n'a aucun contact (figure 1D, flèche). Il existe également un marquage de la P-Cx43 dans la région périnucléaire (figure 1D, tête de flèche).

B) Caractérisation de la localisation de la pan-Cx43 dans les cellules TtT-GF en présence ou en absence de sérum

Nous avons étudié l'effet des facteurs sériques sur la localisation et le niveau d'expression de la Cx43 et de ses formes phosphorylées. Pour ce faire, nous avons incubé des cellules TtT/GF en présence de sérum pendant 2 jours puis nous avons remplacé le milieu par un milieu frais contenant ou non du sérum pendant une période de 48 heures avant d'effectuer la préparation des cellules pour la microscopie à fluorescence. Nous avons marqué les cellules avec l'anticorps anti- Pan-Cx43 et également à la phalloïdine pour distinguer les filaments d'actine et la forme des cellules TtT/GF (figure 2). L'étude a démontré que même si la forme cellulaire était affectée par l'absence de sérum, la localisation de la Cx43 n'était pas modifiée par l'absence de sérum dans le milieu d'incubation. Le marquage de la Cx43 se situe dans la région périnucléaire (figure 2, Pan-Cx43, sérum (+) et sérum (-), têtes de flèche) et sur la membrane plasmique (figure 2, Pan-Cx43, sérum (+) et sérum (-), flèches) en

présence et en absence de sérum. Par contre, lorsque l'on compare l'intensité du marquage de la Pan-Cx43 dans les cellules cultivées en présence de sérum avec celui des cellules cultivées en absence de sérum, on remarque que le marquage est plus faible dans la région périnucléaire des cellules cultivées en absence de sérum (figure 2, Pan-Cx43, sérum (-), tête de flèche). De même, dans ces cellules, le marquage à la membrane plasmique se limite aux contacts cellulaires ou à proximité de ces contacts (figure 2, Pan-Cx43, sérum (-), flèches). De plus, la localisation de la Cx43 à la membrane se retrouve aux extrémités des prolongements cytoplasmiques des cellules TtT/GF (filopodes) (comparer figure 2, Pan-Cx43 et actine, flèches). Ces filopodes sont des extensions fines de la membrane plasmique contenant des filaments d'actine. L'absence de sérum ne semble pas influencer la localisation et de la Cx43 aux extrémités des filaments d'actine.

C) Distribution intracellulaire de la Pan-Cx43 dans les cellules TtT/GF

Afin de déterminer l'association de la Pan-Cx43 à certains organites cellulaires, nous avons effectué un fractionnement subcellulaire de cellules TtT/GF. Pour ce faire, nous avons cultivé les cellules dans un milieu contenant 5% de sérum. Nous avons ensuite récupéré puis brisé les cellules mécaniquement avant de les soumettre à une série de centrifugations afin d'isoler le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi (Golgi), les lysosomes (Lys) et la fraction cytosolique (Cyt) (voir Matériels et Méthodes). Les échantillons ont ensuite été préparés pour l'immunobuvardage. La révélation des échantillons avec l'anticorps anti-Lamp-1, un marqueur de lysosomes, indique que la majorité des lysosomes se retrouve dans la fraction lysosomiale mais qu'une quantité non négligeable se retrouve aussi dans la fraction golgienne (figure 3, Lamp-1). La révélation des échantillons à l'aide du marqueur du réticulum

endoplasmique anti-Calnexine indique que des membranes du réticulum endoplasmique rugueux sont récupérées dans toutes les fractions (figure 3, calnexine). Nous avons été incapables d'obtenir des bandes avec deux marqueurs de l'appareil de Golgi : le TGN38 et le GM130. Ou bien les échantillons étaient trop dilués ou les anticorps ne fonctionnaient pas en dans les conditions utilisées pour l'immunobuvardage. Cette absence de marqueur de Golgi ne permet pas de vérifier la pureté de la fraction golgienne ni la présence d'impuretés provenant du Golgi dans les autres fractions. Les résultats démontrent que la Pan-Cx43 se retrouve majoritairement dans la fraction lysosomiale (figure 3, Pan-Cx43). On retrouve également la Pan-Cx43 dans les fractions du réticulum endoplasmique et possiblement dans la fraction golgienne.

D) Étude sur la localisation intracellulaire de la NP-Cx43 et de sa co-localisation avec différents organites dans les cellules TtT/GF

Lorsque l'on observe la localisation de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF (figure 1C), on remarque que la majeure partie du marquage de la NP-Cx43 se situe dans une région périnucléaire. Afin de déterminer la localisation exacte de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF, nous avons préparé des cellules pour la microscopie à fluorescence et avons effectué un double marquage avec l'anticorps anti-NP-Cx43 et d'autres anticorps ou marqueurs d'organites. Enfin, nous avons observé les résultats au microscope confocal. L'anticorps contre la calnexine a été utilisé comme marqueur du réticulum endoplasmique rugueux. Le double marquage de la NP-Cx43 et de la calnexine (figure 4, haut) n'a pas permis d'observer une co-localisation entre la NP-Cx43 et le réticulum endoplasmique (voir merged). L'anticorps anti-Lamp-1 est un

marqueur de lysosomes. Un double marquage permet d'observer une co-localisation partielle de Lamp-1 avec la NP-Cx43 (figure 4 bas, tête de flèche).

La lectine WGA (wheat germ agglutinin) reconnaît quant à elle l'appareil de Golgi en entier. Un double marquage de la NP-Cx43 avec la lectine WGA (figure 5, haut) montre une légère co-localisation entre la NP-Cx43 et le marqueur de l'appareil de Golgi (figure 5 haut, tête de flèche). L'anticorps anti-TGN38 reconnaît seulement le *trans* Golgi. L'observation du double marquage de la NP-Cx43 et de TGN38 permet de voir une légère co-localisation entre les deux anticorps (voir figure 5 bas, tête de flèche).

E) Cinétique de l'expression et de la localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF incubées avec l'IL-1 β et le TNF α

1. Immunobuvardage

Les cellules TtT/GF sont la cible de cytokines pro-inflammatoires, c'est pourquoi nous avons étudié l'effet de ces cytokines sur l'expression et la localisation de la forme non phosphorylée et des formes phosphorylées de la Cx43. Pour ce faire, nous avons exposé les cellules à 10 ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/ml de TNF α pour différentes périodes de temps. Nous avons ensuite séparé les cellules en fractions enrichies en membranes et en fractions cytosoliques pour effectuer un immunobuvardage avec les anticorps anti-NP-Cx43 et anti-P-Cx43. Lorsque l'on examine les résultats des extraits membranaires de cellules exposées à l'IL-1 β on remarque que le niveau d'expression de la NP-Cx43 augmente après 1 heure d'exposition et diminue par la suite (figure 6,

NP-Cx43, fractions membranaires,). Le niveau d'expression dans les fractions membranaires de la P-Cx43 augmente plutôt après deux heures d'exposition et diminue fortement après 24 heures d'exposition (figure 6, fractions membranaires, P-Cx43). L'expression de la NP-Cx43 dans la fraction cytosolique augmente après 2 et 6 heures d'exposition à l'IL-1 β et son expression chute par la suite (figure 6, fractions cytosoliques, NP-Cx43). Les mêmes observations peuvent être rapportées au sujet de la présence de la P-Cx43 dans les fractions cytosoliques (figure 6, fractions cytosoliques, P-Cx43). Le niveau d'expression augmente fortement de 2 à 6 heures d'exposition à l'IL-1 β et on observe ensuite une forte diminution de l'association de la P-Cx43 à la fraction cytosolique.

Les résultats obtenus sur des fractions membranaires exposées à différentes temps au TNF α démontrent une augmentation de l'expression de la NP-Cx43 après 1 heure d'exposition (figure 7, fractions membranaires, NP-Cx43). L'expression diminue ensuite à partir de 6 heures d'exposition et reste stable jusqu'à 24 heures. L'expression de la P-Cx43 dans les fractions membranaires augmente après 1 à 2 heures d'exposition et chute par la suite après 6 heures d'exposition (figure 7, fractions membranaires, P-Cx43). L'analyse du niveau d'expression de la NP-Cx43 dans les fractions cytosoliques traitées à différentes périodes de temps au TNF α permet de constater une augmentation de l'expression après 2 heures d'exposition et une diminution après 6 heures d'exposition (figure 7, fractions cytosoliques, NP-Cx43). L'expression de la P-Cx43 dans les fractions cytosoliques de cellules exposées au TNF α augmente légèrement après 1 à 2 heures d'exposition et diminue à partir de 6 heures d'exposition (figure 7, fractions cytosoliques, P-Cx43).

2. Immunofluorescence

Par la suite, nous avons étudié l'effet de l'IL-1 β et du TNF α sur la localisation de la Cx43 non phosphorylée en sérine 368 (NP-Cx43) et de la Cx43 phosphorylée en sérine 368 (P-Cx43). Pour ce faire, nous avons cultivé des cellules TtT/GF en présence de sérum et nous avons exposé ces cellules à 25 ou 50 ng/ml de TNF α ou 10ng/ml d'IL-1 β à différentes périodes de temps. Nous avons ensuite préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence. Les résultats démontrent une augmentation de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire après 1h d'exposition des cellules à l'IL-1 β . Cette augmentation continue jusqu'à 2 heures d'exposition (figure 8, NP-Cx43, têtes de flèche). Le marquage de la NP-Cx43 commence à diminuer après 6 heures d'exposition et chute après 24 heures. Lorsque l'on observe le marquage de la P-Cx43 à différents temps d'exposition des cellules à l'IL-1 β (figure 8, P-Cx43), on remarque une augmentation dans la région périnucléaire après 1h d'exposition à l'IL-1 β et ce jusqu'à 6 heures d'exposition (figure 8, têtes de flèches). On observe également une augmentation du marquage à la membrane plasmique après 6 heures d'exposition (Figure 8, P-Cx43 6h, flèche). Le niveau d'expression de la P-Cx43 devient bas après 24 d'exposition.

Lorsque l'on analyse le marquage de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF incubées en présence de TNF α pendant différentes périodes de temps (figure 9), on observe sensiblement la même tendance qu'avec les traitements à l'IL-1 β . Une augmentation du marquage de la NP-Cx43 a lieu après 1 heure d'exposition et cette tendance se prolonge jusqu'à 6 heures d'exposition au TNF α (figure 9, NP-Cx43, têtes de flèche). Le marquage de la NP-Cx43 diminue après 24h d'exposition au TNF α .

Quant au marquage de la P-Cx43, il augmente très peu dans la région périnucléaire au cours des différents temps d'exposition. Par contre, le marquage de la P-Cx43 à la membrane plasmique augmente à partir de 2 heures et se prolonge jusqu'à 6 heures d'exposition au TNF α (figure 9, P-Cx43).

3.2. ÉTUDES SUR LA CO-LOCALISATION DE LA CX43 APRÈS EXPOSITION AUX CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES

A) Étude sur la distribution de la NP-Cx43 et la P-Cx43 après exposition à l'IL-1 β ou au TNF α

Nos études d'immunobuvardage indiquent une augmentation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les fractions membranaires et cytosoliques de cellules exposées à l'IL-1 β et au TNF α . De plus, nos résultats en immunofluorescence démontrent une augmentation du marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire et une augmentation de l'association de la P-Cx43 à la membrane plasmique dans des cellules traitées à l'IL-1 β et au TNF α . Pour comprendre ces phénomènes, nous avons exposé les cellules à 10 ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/mL de TNF α à différentes périodes de temps et nous avons ensuite préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence. Nous avons ensuite effectué un double marquage entre la NP-Cx43 et la P-Cx43 sur les cellules exposées à l'IL-1 β (figure 10) et au TNF α (figure 11) pour étudier la co-localisation de ces deux formes. Nos résultats démontrent une co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 à la membrane plasmique (figures 10 et 11, têtes de flèche) et parfois dans la région périnucléaire (figures 10 et 11, flèches). Lorsque les cellules TtT/GF sont traitées avec de l'IL-1 β , la co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43

augmente dans la région périnucléaire après 6 heures d'exposition et la co-localisation revient au même niveau que le contrôle après 24 heures d'exposition à l'IL-1 β . La co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 ne semble pas être affectée par la présence des TNF α .

B) Étude sur la co-localisation de la NP-Cx43 avec des organites après exposition à l'IL-1 β ou au TNF α

Nos études d'immunofluorescence indiquent une augmentation de la NP-Cx43 particulièrement dans la région périnucléaire après exposition des cellules aux cytokines pro-inflammatoires. Pour mieux caractériser ces résultats, nous avons exposé les cellules à 10 ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/mL de TNF α à différentes périodes de temps. Par la suite, nous avons préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et étudié la co-localisation de la NP-Cx43 avec certains organites normalement associé à la région périnucléaire. Pour ce faire, nous avons effectué un double marquage de la NP-Cx43 avec les anticorps anti-TGN38 et anti-Lamp-1. Les études de double marquage de la NP-Cx43 et la TGN38 ne démontrent pas une modification significative de la co-localisation de la NP-Cx43 et du marqueur de l'appareil de Golgi par rapport au contrôle (figure 12). Le double marquage effectué avec NP-Cx43 et Lamp-1 en présence d'IL-1 β (figure 13) et de TNF α (figure 14) donne des résultats en fonction du temps d'exposition des cytokines. Le traitement des cellules avec l'IL-1 β augmente la co-localisation de la NP-Cx43 avec Lamp-1 après 1 heure d'exposition et cette co-localisation se maintient jusqu'à 24 d'exposition (figure 13, flèches). Le même phénomène est observé avec des cellules incubées avec le TNF α . Après 1 heure d'exposition, la co-localisation de la NP-Cx43 et de Lamp-1 augmente et cette co-

localisation se maintient tout au long de l'incubation des cellules avec le $\text{TNF}\alpha$ (figure 14, flèches).

3.3. EFFET DE SUBSTANCES AFFECTANT LA SYNTHÈSE OU LA DÉGRADATION DE LA CONNEXINE SUR SON EXPRESSION ET SA LOCALISATION DANS LES CELLULES TtT/GF

A) Effet de la cycloheximide

1. Immunofluorescence.

La cycloheximide (CHX) est un inhibiteur de la traduction des protéines. La Cx43 est reconnue pour avoir une durée de vie très courte et sa dégradation implique la voie des protéasomes et des lysosomes (Musil et col., 2000). L'utilisation de la cycloheximide nous a permis de vérifier si l'augmentation en présence des cytokines pro-inflammatoires du taux de la Cx43 dans les fractions membranaires et cytosoliques et l'augmentation du marquage de la Cx43 particulièrement dans la région périnucléaire impliquait une stimulation de la synthèse de la protéine. Pour étudier cette possibilité, nous avons incubé des cellules TtT/GF pendant 30 minutes avec $20\mu\text{g/ml}$ de cycloheximide avant de les exposer ou non à l'IL- 1β ou au $\text{TNF}\alpha$ pendant une période de 2 heures. Ensuite, nous avons préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et nous avons étudié le marquage de la NP-Cx43 (figure 15) et de la P-Cx43 (figure 16). Lorsque l'on compare les cellules contrôles avec les cellules incubées en présence de cycloheximide, on remarque une baisse significative du marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire (figure 15, contrôle, CHX (+)). La cycloheximide inhibe aussi l'augmentation du marquage dans la région périnucléaire induite par l'IL- 1β et le $\text{TNF}\alpha$. Par contre le marquage de la NP-Cx43 à

la membrane n'est pas affecté. Aussi, lorsque l'on compare le marquage de la P-Cx43 dans les cellules contrôles CHX (-) avec les cellules contrôles incubées en présence de CHX (figure 16), on remarque une diminution du marquage de la P-Cx43 à la membrane plasmique. Par contre, le marquage de la P-Cx43 ne semble pas être affecté par la CHX dans les cellules incubées en présence des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, on peut observer dans le cas des cellules exposées à l'IL-1 β que la présence de la CHX diminue la taille de plaques de P-Cx43 à la membrane plasmique.

2. Études d'immunobuvardage.

Afin de vérifier l'exactitude des résultats obtenus en immunofluorescence, nous avons préparé les cellules TtT/GF selon le même protocole. Nous avons incubé les cellules en présence ou en absence de CHX pendant une période de 30 minutes. Ensuite les cellules ont été exposées ou non aux cytokines pendant une période de 2 heures. Nous avons ensuite préparé des fractions membranaires et cytosoliques pour effectuer un immunobuvardage avec des anticorps anti-NP-Cx43 et anti-P-Cx43. La figure 17 représente le taux d'association de la NP-Cx43 aux fractions membranaires et cytosoliques dans des cellules TtT/GF incubées en présence ou en absence de CHX et exposées ou non à l'IL-1 β ou au TNF α . Les résultats démontrent que dans les cellules contrôles, la présence de CHX diminue le taux de la NP-Cx43 dans les fractions membranaires (figure 17, fractions membranaires, contrôle). Par contre, la diminution du taux de la NP-Cx43 en présence de CHX n'est pas observée lorsque les cellules sont incubées en présence d'IL-1 β ou de TNF α . Lorsque l'on analyse le taux de la NP-Cx43 dans les fractions cytosoliques on remarque le phénomène inverse. La présence de CHX ne diminue pas de manière significative le taux de la NP-Cx43 dans

la fraction cytosolique des cellules contrôles (figure 17, fractions cytosoliques, contrôle). Toutefois, on remarque une diminution du taux de la NP-Cx43 dans les fractions cytosoliques des cellules incubées en présence d'IL-1 β ou de TNF α (figure 17, fractions cytosoliques, IL 2h et TNF 2h).

Lorsque l'on étudie l'association de la P-Cx43 aux fractions membranaires de cellules TtT/GF on remarque que la cycloheximide diminue cette association dans les cellules contrôles CHX (+) (figure 18, fractions membranaires, C). Par contre, la présence d'IL-1 β ou de TNF α prévient la diminution induite par la cycloheximide observée dans les cellules contrôles (figure 18, fractions membranaires, IL 2h et TNF 2h). Notons que la présence de la P-Cx43 chez les cellules incubées en présence d'IL-1 β et de TNF α est plus élevée que celle des cellules contrôles CHX. L'observation de l'association de la P-Cx43 aux fractions cytosoliques permet de constater que la cycloheximide réduit cette association dans les cellules incubées en absence et en présence des cytokines IL-1 β ou TNF α , particulièrement dans le cas des cellules exposées au TNF α (figure 18, fractions cytosoliques).

B) Effet de la leupeptine

La leupeptine est un inhibiteur de protéases lysosomiales. L'inhibition de la dégradation de la Cx43 par les lysosomes peut avoir un impact important sur la demi-vie de la protéine et par conséquent sur la communication intercellulaire. Étant donné l'association des formes phosphorylées et non phosphorylée de la Cx43 avec la fraction lysosomiale et avec les lysosomes, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de l'activité de ces organites sur l'effet des cytokines pro-inflammatoires. Pour ce

faire, nous avons incubé des cellules TtT/GF en absence ou en présence de 100 μ M de leupeptine pendant une période de 30 minutes avant de les exposer ou non pendant 2 heures aux cytokines IL-1 β ou TNF α . Nous avons ensuite préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et les avons marqué à l'aide des anticorps anti-NP-Cx43, anti-P-Cx43 et anti-Lamp-1. Lorsque l'on compare la localisation de la NP-Cx43 dans les cellules contrôles traitées ou non avec la leupeptine (figure 19), on remarque que la localisation de cette protéine n'est pas affectée. Aussi, l'augmentation du marquage périnucléaire de la NP-Cx43 induite par les cytokines IL-1 β ou TNF α ne semble pas être influencée par la présence de leupeptine. Par contre, dans ces mêmes cellules, la présence de leupeptine cause une augmentation du marquage de la NP-Cx43 au niveau de la membrane aux contacts cellulaires (figure 19, NP-Cx43, IL 2h et TNF 2h, Leup (+), flèches). Le double marquage de la NP-Cx43 avec lamp-1 démontre qu'une partie de la NP-Cx43 se localise au niveau des lysosomes. Les lysosomes semblent également avoir augmenté de volume en présence de leupeptine. Les résultats du marquage de la P-Cx43 en présence de leupeptine (figure 20) démontrent clairement que la présence de leupeptine augmente le marquage de la P-Cx43 à la membrane plasmique dans les cellules contrôles et dans les cellules exposées à l'IL-1 β (figure 20, flèches). Dans les cellules incubées en présence de TNF α , cette augmentation est moins évidente.

C) Effet de la lactacystine

La voie de dégradation des protéasomes est très souvent utilisée pour dégrader des protéines dont la demi-vie est très courte. La littérature indique que la Cx43 est en partie dégradée dans les protéasomes (Musil et col., 2000). Nous avons voulu étudier

l'impact des protéasomes sur l'augmentation de la Cx43 induite par les cytokines pro-inflammatoires. Pour ce faire, nous avons incubé des cellules TtT/GF en présence ou en absence de 15 μ M de lactacystine, un inhibiteur de protéasomes, pendant 30 minutes avant d'incuber les cellules en présence ou en absence des cytokines IL-1 β ou TNF α . Nous avons ensuite préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et effectué un marquage avec les anticorps anti-NP-Cx43, anti-P-Cx43 et anti-Lamp-1. Lorsque l'on observe le marquage de la NP-Cx43 dans les cellules incubées en présence de lactacystine (Lac (+)), on observe très peu de changements au niveau de la localisation de cette protéine (figure 21). Le marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire diminue légèrement dans les cellules contrôles. Par contre, la présence de lactacystine n'a pas d'influence sur la localisation et le marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire des cellules traitées aux cytokines. Une augmentation du marquage au niveau de la membrane plasmique aux contacts cellulaires est observée en présence de lactacystine dans les cellules contrôle (figure 21, contrôle, Lac (+), flèche). Toutefois, la présence de lactacystine n'entraîne aucune accumulation de la NP-Cx43 à la membrane plasmique lorsque les cellules sont exposées aux cytokines. Le double marquage effectué avec la protéine lamp-1 suggèrent une colocalisation partielle de la NP-Cx43 au niveau des lysosomes. Enfin, la lactacystine (figure 22) induit une augmentation du marquage de la P-Cx43 à la membrane plasmique lorsque les cellules sont incubées en absence ou en présence des cytokines. Notons que l'accumulation de la P-Cx43 à la membrane plasmique induit par la lactacystine en absence ou en présence des cytokines augmente la taille des plaques aux contacts cellulaires (figure 22, Lac (+), flèches).

3.4. EFFET DES CYTOKINES IL-1 β ET TNF α SUR LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE DES CELLULES TtT/GF

La calcéine est un colorant qui ne peut diffuser à travers la membrane plasmique mais dont le poids moléculaire est assez petit pour traverser les jonctions gap lorsque celles-ci sont ouvertes. Afin de savoir si l'augmentation de l'expression de la Cx43 induite par les cytokines IL-1 β et TNF α avait une influence sur la communication intercellulaire des cellules TtT/GF nous avons observé la diffusion de ce colorant à travers les jonctions gap en présence et en absence de ces cytokines pro-inflammatoires. Pour ce faire, nous avons incubé les cellules sur des lamelles de verre puis nous avons cultivé les cellules avec du milieu contenant ou non l'IL-1 β ou le TNF α pendant une période de 2 heures. Après cette exposition, nous avons effectué une série de rayures parallèles d'un bout à l'autre de chacune des lamelles et nous avons incubé les cellules en présence de 0.5 M de calcéine pendant 15 minutes à 4°C. Nous avons ensuite fixé et préparé les cellules avant de les observer par microscopie à fluorescence. La figure 23 A représente la diffusion du colorant dans les cellules contrôle. Nous pouvons remarquer que les cellules brisées par la rayure ont absorbé la calcéine et que le colorant s'est diffusé à travers les premières rangées de cellules (23 A, flèche). Lorsque l'on observe la diffusion de la calcéine dans les cellules incubées en présence d'IL-1 β ou de TNF α , on remarque que cette diffusion s'étend sur un plus grand nombre de cellules (23 B et C, flèches).

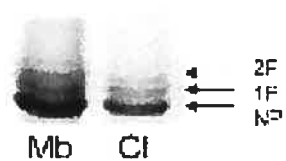
3.5. EXPRESSION DE LA Cx43 ET DE SES FORMES PHOSPHORYLÉES DANS L'HYPOPHYSE ANTÉRIEURE DE VISON

L'hypophyse antérieure est composée de cellules endocrines et non endocrines et ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions gap. Notre hypothèse est que cette connexion par les jonctions gap entre les cellules de l'hypophyse antérieure permettrait la synchronisation de la sécrétion hormonale de la glande (Fauquier et col., 2002). Puisque nos résultats démontrent une modulation de l'expression et de la localisation de la Cx43 dans les cellules TtT/GF, nous voulions savoir si des cytokines, hormones ou autres molécules régulatrices de l'hypophyse antérieure seraient en mesure de moduler l'expression de la Cx43 à l'intérieur de la glande. Des études antérieures de notre laboratoire ont prouvé que l'expression de la Cx43 était modulée durant le cycle annuel de reproduction du vison (Vitale et col., 2001). Nous avons donc recueilli des hypophyses de vison mâles à différents mois de l'année et nous avons vérifié l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 pour chacun de ces mois. La figure 24 montre l'expression de la NP-Cx43 (A) et de la P-Cx43 (B) dans des hypophyses de vison mâle recueillies la dernière semaine des mois de février, mai et août. Les résultats démontrent que l'expression de la NP-Cx43 est très faible en février et qu'elle augmente en mai et en août (figure 24 A). Les mêmes résultats sont obtenus avec P-Cx43 (figure 24 B). Les résultats de la P-Cx43 en mai et août suggèrent même la présence d'une autre bande d'un poids moléculaire plus élevé (figure 24 B, flèche).

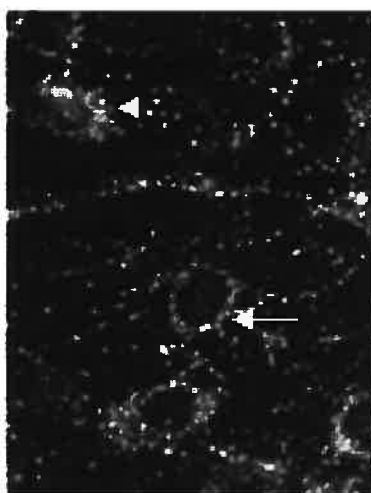
Figure 1 : Expression et localisation de la Cx43 non phosphorylée, mono- et di-phosphorylée dans les cellules TtT/GF.

Nous avons incubé des cellules TtT/GF dans du milieu d'incubation contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Nous avons ensuite préparé des fractions membranaires (Mb) et cytosoliques (Cl) et nous avons effectué un immunobuvardage avec l'anticorps anti-Pan-Cx43 (A). Nous avons aussi préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et nous les avons marqués avec les anticorps anti-Pan-Cx43 (B), anti-NP-Cx43 (C) et anti-P-Cx43 (D). Les résultats en immunoburvardage démontrent que trois bandes électrophorétiques sont visibles dans les deux fractions (A). La bande ayant migrée le plus rapidement (bande du bas) correspond à la forme non phosphorylée (NP) de la Cx43 et les deux autres représentent la Cx43 mono- (1P) et di- (2P) phosphorylée. Les résultats en immunofluorescence sur le marquage de toutes les formes de la Cx43 montrent que cette protéine est associée à la membrane plasmique (flèches) et à la région périnucléaire (tête de flèche). L'utilisation de l'anticorps anti-NP-Cx43 indique une association de la NP-Cx43 particulièrement dans la région périnucléaire (C, tête de flèche) et une petite proportion du marquage est associée à la membrane plasmique (C, flèche). Le marquage de la P-Cx43 est plutôt membranaire (D, flèche) et une petite proportion du marquage est associée à la région périnucléaire (D, tête de flèche).

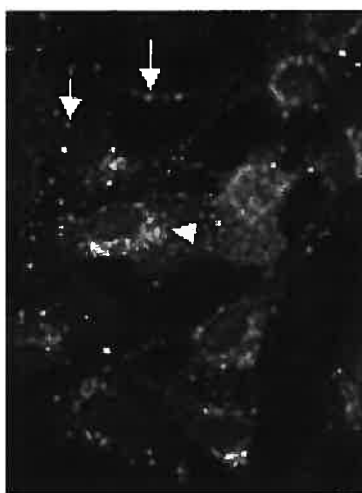
A



B



C



D

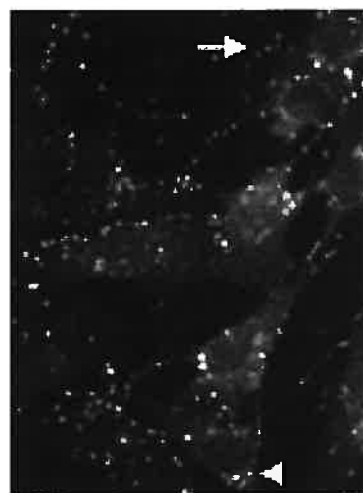


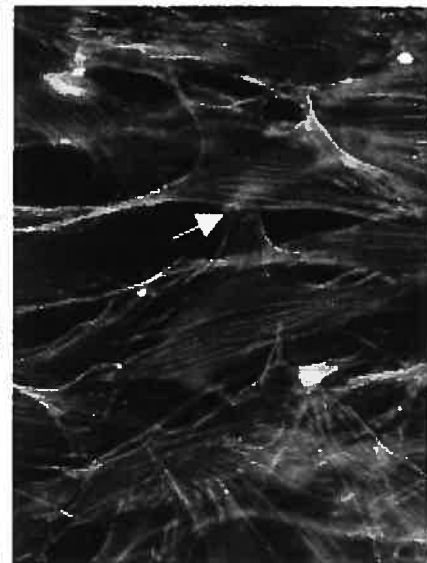
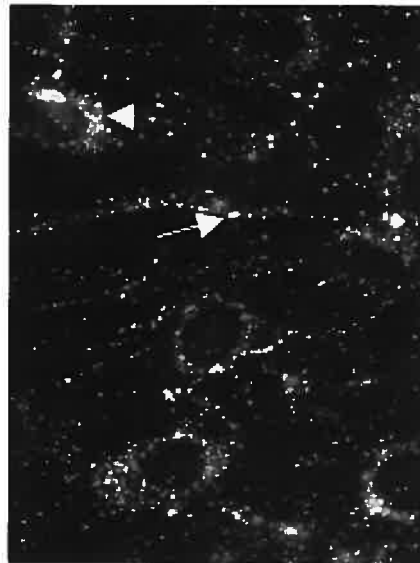
Figure 2 : Caractérisation de la localisation de la Pan-Cx43 dans les cellules TtT-GF en présence ou en absence de sérum.

Les cellules TtT/GF ont été mises en culture dans du milieu d'incubation contenant 5% de sérum pendant 2 jours. Les cellules ont été par la suite incubées pendant 2 jours dans un milieu contenant 5% de sérum (Sérum (+)) ou ne contenant pas de sérum (Sérum (-)). Ensuite nous avons préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et nous les avons doublement marquées avec l'anticorps anti-Pan-Cx43 et la phalloïdine-rhodamine pour mettre en évidence la localisation de la Cx43 par rapport à la forme cellulaire et aux filaments d'actine. Le marquage de la Pan-Cx43 se situe dans la région périnucléaire (Pan-Cx43, tête de flèche), à la membrane plasmique et à l'extrémité des filopodes des cellules cultivées en présence de sérum (Pan-Cx43, flèches). L'absence de sérum affecte la forme cellulaire. La cellule en présence de sérum est une cellule allongée contenant de longs prolongements cytoplasmiques et de fins filaments d'actine (actine, sérum (+)). En absence de sérum la cellule prend une forme polygonale et les filaments sont plus abondants (actine, sérum (-)). L'absence de sérum n'affecte pas la localisation de la Pan-Cx43 mais le marquage diminue dans la région périnucléaire (Pan-Cx43, sérum (-), tête de flèche).

Pan-Cx43

Actine

Sérum
(+)



Sérum
(-)

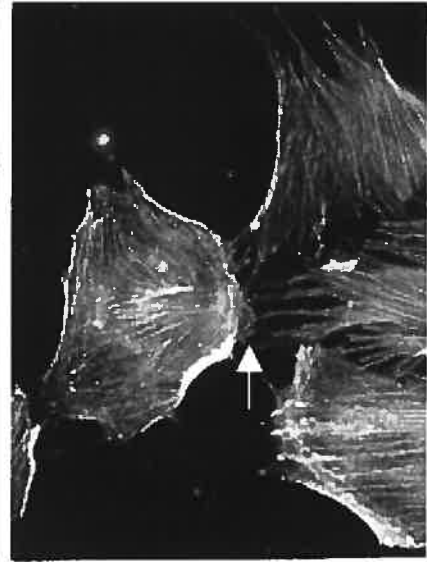
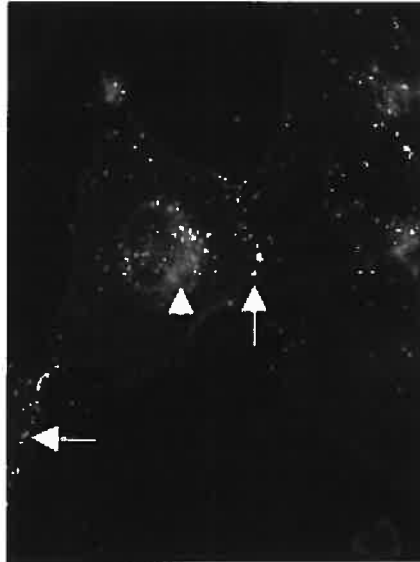


Figure 3 : Distribution sous-cellulaire de la Pan-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Les cellules TtT/GF ont été mises en culture dans du milieu d'incubation contenant 5% de sérum. Par la suite, les cellules ont été récupérées et brisées mécaniquement. La préparation des fractions subcellulaires de réticulum endoplasmique rugueux (RE), de Golgi (Golgi) de lysosomes (Lys) et de cytosol (Cyt) de cellules TtT/GF s'est faite par plusieurs étapes de centrifugation (voir Matériels et Méthodes). Les fractions sont ensuite préparées pour l'immuobuvardage et sont révélées avec les anticorps anti-Lamp-1, anti-Calnexine et anti-Pan-Cx43. Une révélation des échantillons avec l'anticorps anti-Lamp-1 indique que la majorité des lysosomes se retrouvent dans la fractions lysosomiale. La révélation des échantillons avec le marqueur de RE permet de constater la présence de microsomes dans toutes les fractions (Calnexine). Les résultats démontrent qu'une grande majorité de la Pan-Cx43 se retrouve dans les lysosomes. La Pan-Cx43 se retrouve également dans les fractions golgienne et du réticulum endoplasmique.

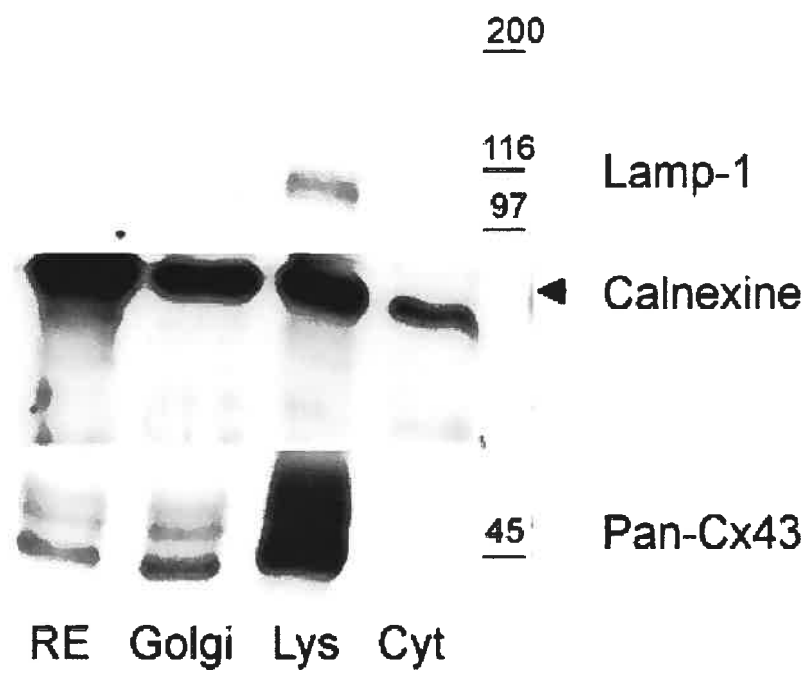
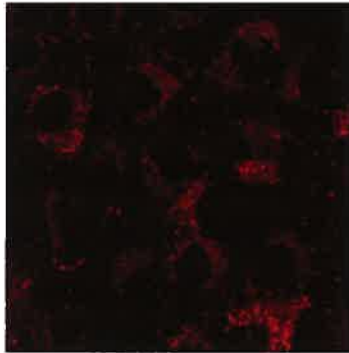


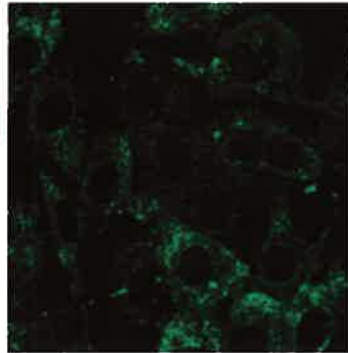
Figure 4 : Études en microscopie confocale sur la co-localisation de la NP-Cx43 avec le réticulum endoplasmique rugueux et les lysosomes dans les cellules TtT/GF.

Nous avons incubé des cellules dans un milieu d'incubation contenant 5% de sérum. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence. Les cellules du haut sont marquées à la fois par l'anticorps anti-NP-Cx43 (rouge) et par l'anticorps anti-Calnexine pour visualiser le réticulum endoplasmique (vert). Le double marquage (merged) indique qu'il n'y a aucune co-localisation entre la NP-Cx43 et le réticulum endoplasmique. Les cellules du bas sont marquées avec l'anticorps NP-Cx43 (rouge) et l'anticorps anti-Lamp-1 (vert) représentant les lysosomes. Le double marquage (merged) indique une co-localisation (jaune) entre la NP-Cx43 et les lysosomes (tête de flèche).

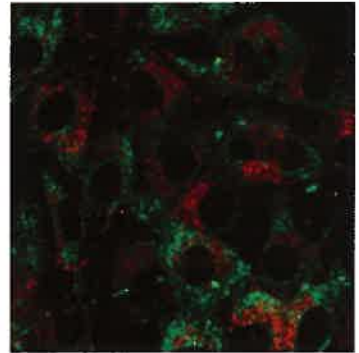
NP-Cx43



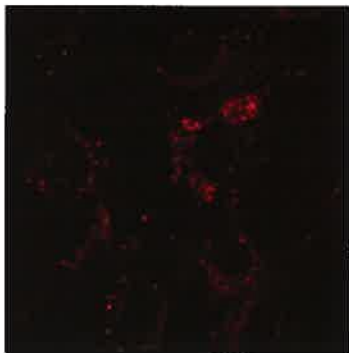
Calnexine



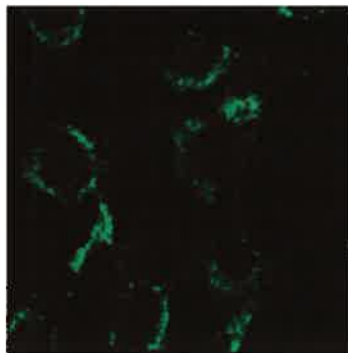
Merged



NP-Cx43



Lamp-1



Merged

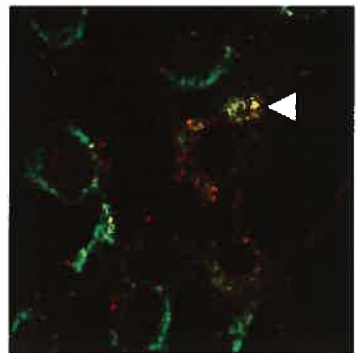
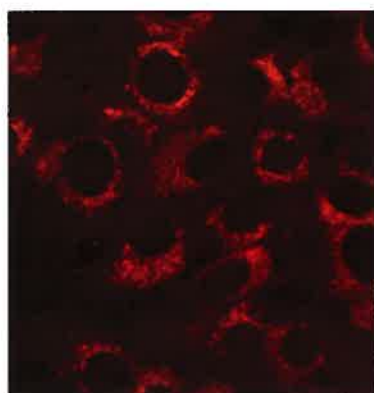


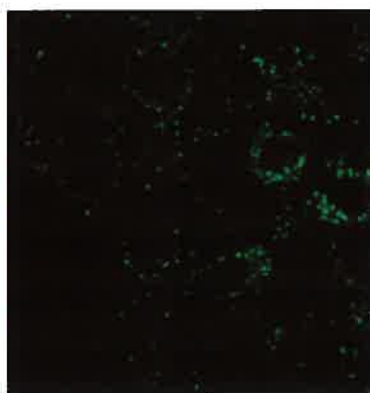
Figure 5 : Études en microscopie confocale sur la co-localisation de la NP-Cx43 avec le Golgi et le *trans* Golgi de cellules TtT/GF.

Nous avons incubé les cellules dans un milieu d'incubation contenant 5% de sérum. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence. Les cellules du haut sont marquées par la lectine WGA (rouge) afin d'observer le Golgi complet et par l'anticorps anti-NP-Cx43 (vert). Le double marquage (merged) indique une faible co-localisation (jaune) entre le Golgi et la NP-Cx43 (tête de flèche). Les cellules du bas sont marquées avec l'anticorps NP-Cx43 (rouge) et l'anticorps TGN38 (vert), un marqueur du *trans* Golgi. Le double marquage (merged) indique que la NP-Cx43 co-localise partiellement (jaune) avec le *trans* Golgi (tête de flèche).

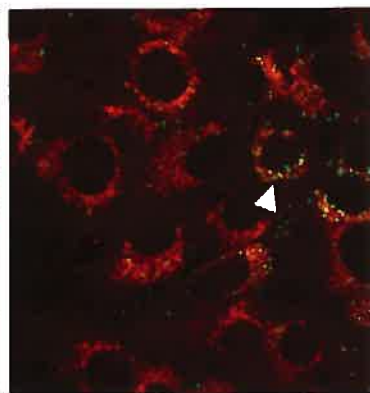
WGA



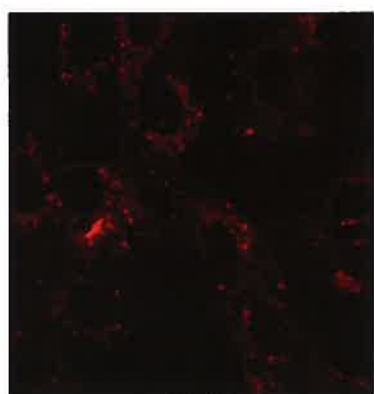
NP-Cx43



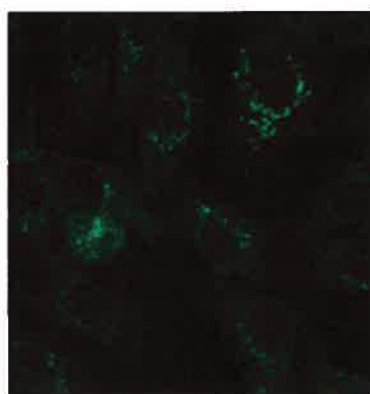
Merged



NP-Cx43



TGN38



Merged

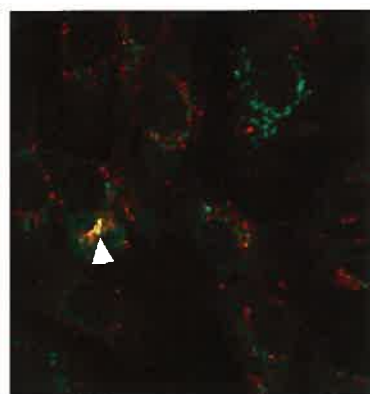
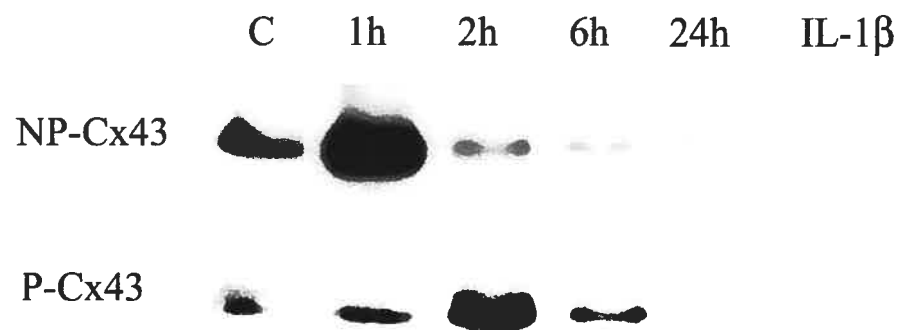


Figure 6 : Effet de l'IL-1 β sur l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans des fractions membranaires et cytosoliques de cellules TtT/GF.

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont ensuite traitées avec 10ng/ml d'IL-1 β pour 0 (contrôle), 1h, 2h, 6h et 24h. Par la suite, les cellules sont récupérées et séparées en fractions membranaires et cytosoliques et préparées pour l'immunobuvardage. L'expression des formes non phosphorylée et phosphorylée en sérine 368 de la Cx43 est révélée par les anticorps anti-NP-Cx43 et anti-P-Cx43. L'expression de la NP-Cx43 des fractions membranaires augmente fortement après 1 heure d'incubation avec l'IL-1 β et diminue par la suite. L'expression de la P-Cx43 augmente après 2 heures d'exposition à l'IL-1 β et cette expression diminue après 6 heures d'exposition. L'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 des fractions cytosoliques augmente de 2 à 6 heures d'exposition à l'IL-1 β et diminue après 24 heures d'exposition.

Fractions membranaires



Fractions cytosoliques

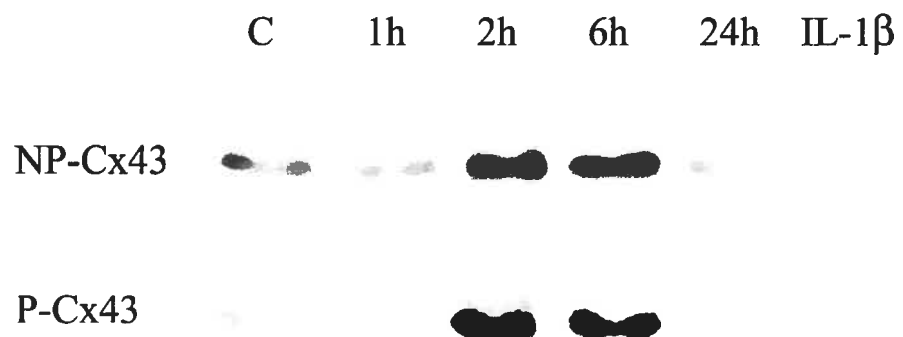
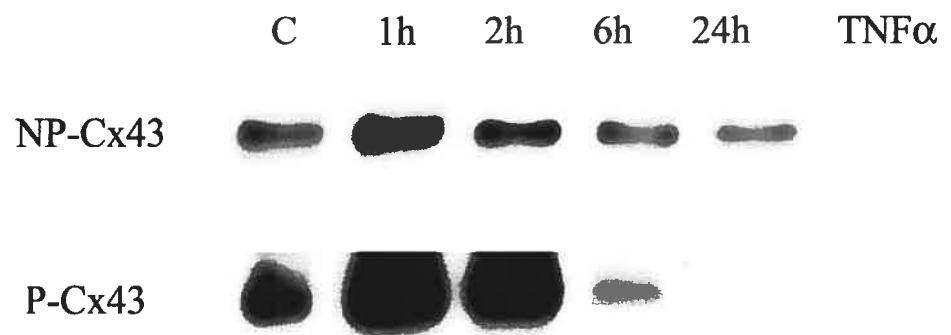


Figure 7 : Effet du $\text{TNF}\alpha$ sur l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans des fractions membranaires et cytosoliques de cellules TtT/GF.

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont ensuite traitées avec 25ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ pour une durée de 0 (contrôle), 1h, 2h, 6h et 24h. Par la suite, les cellules sont récupérées et séparées en fractions membranaires et cytosoliques et préparées pour l'immunobuvardage. L'expression de la NP-Cx43 dans la fraction membranaire augmente après 1 heure d'exposition au $\text{TNF}\alpha$. L'expression de la P-Cx43 des fractions membranaires augmente après 1 et 2 heures d'exposition au $\text{TNF}\alpha$ et diminue après 6 heures d'exposition. L'expression de la NP-Cx43 des fractions cytosoliques augmente après 2 heures d'exposition et diminue après 6 heures d'exposition au $\text{TNF}\alpha$. L'expression de la P-Cx43 des fractions cytosoliques augmente après 1 à 2 heures d'exposition et diminue après 6 heures d'exposition au $\text{TNF}\alpha$.

Fractions membranaires



Fractions cytosoliques

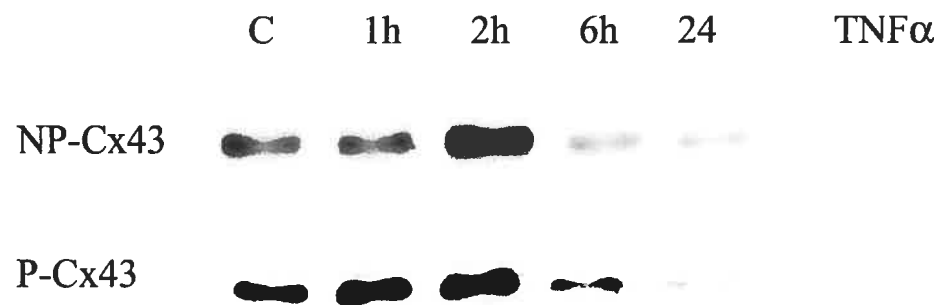


Figure 8 : Effet de l'IL-1 β sur la localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont ensuite incubées avec 10ng/ml d'IL-1 β pour 0 (contrôle), 1h, 2h, 6h et 24h avant d'être préparées pour le double marquage NP-Cx43 et P-Cx43 en microscopie à fluorescence. Les figures du haut représentent le marquage de la NP-Cx43. Le marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire augmente après 1 heure d'exposition et se poursuit à 2 heures (têtes de flèche). Les figures du bas représentent le marquage de la P-Cx43 des mêmes cellules. Le marquage de la P-Cx43 augmente dans la région périnucléaire après 1 à 2 heures d'exposition (têtes de flèche) et la localisation de la P-Cx43 à la membrane plasmique augmente après 6 heures d'exposition (flèches).

3x4x C P Z

3x4x C P D

contrôle

1h

2h

6h

24h

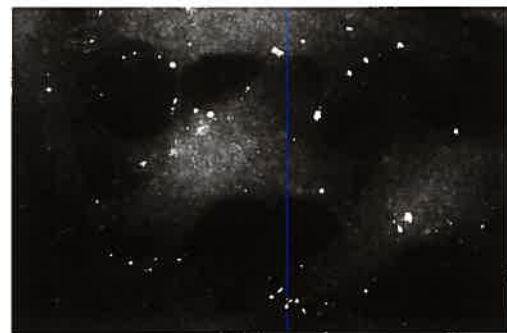
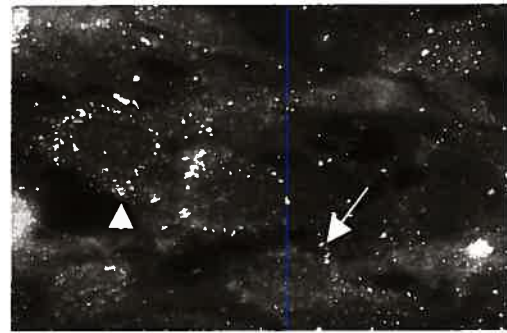
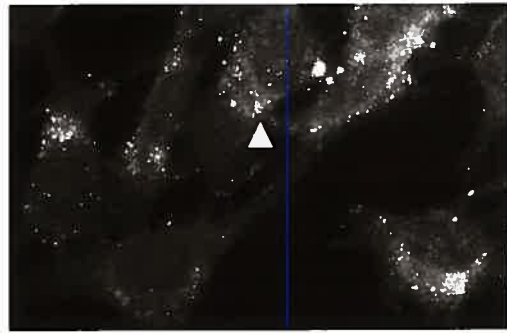
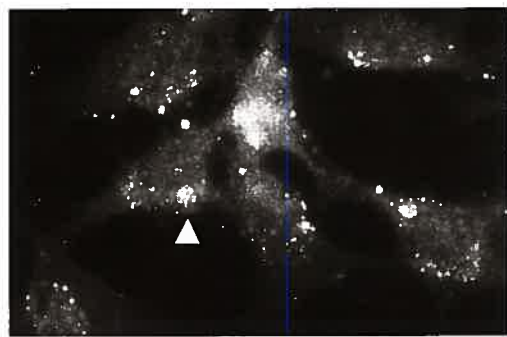
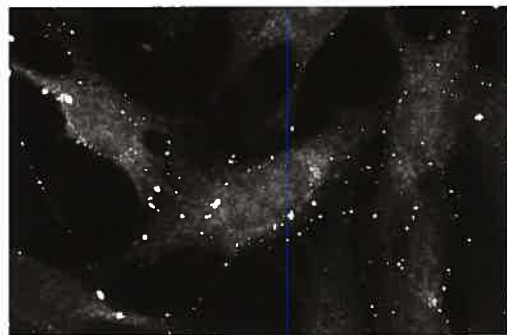
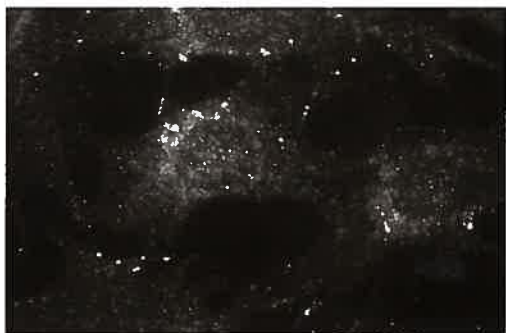
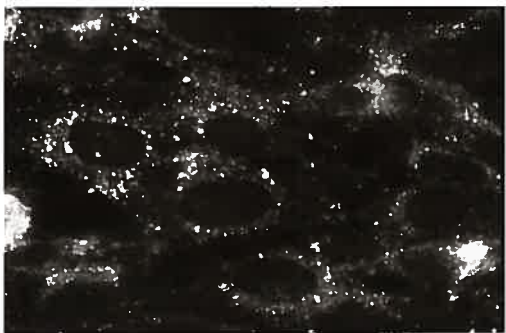
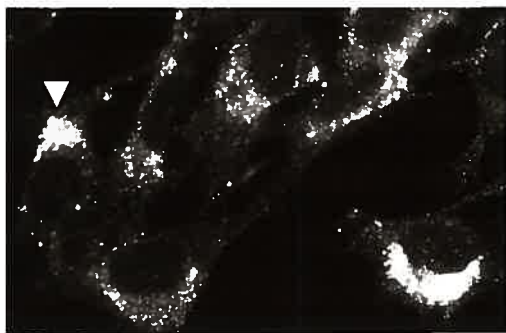
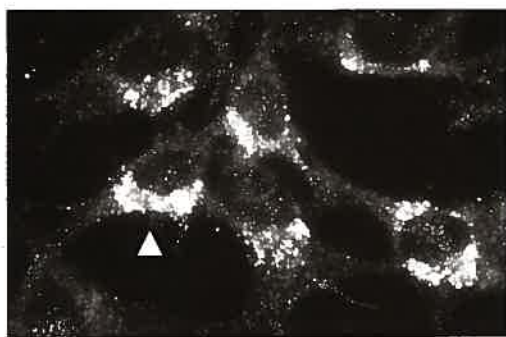
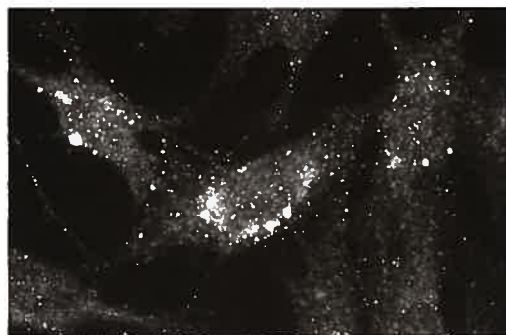
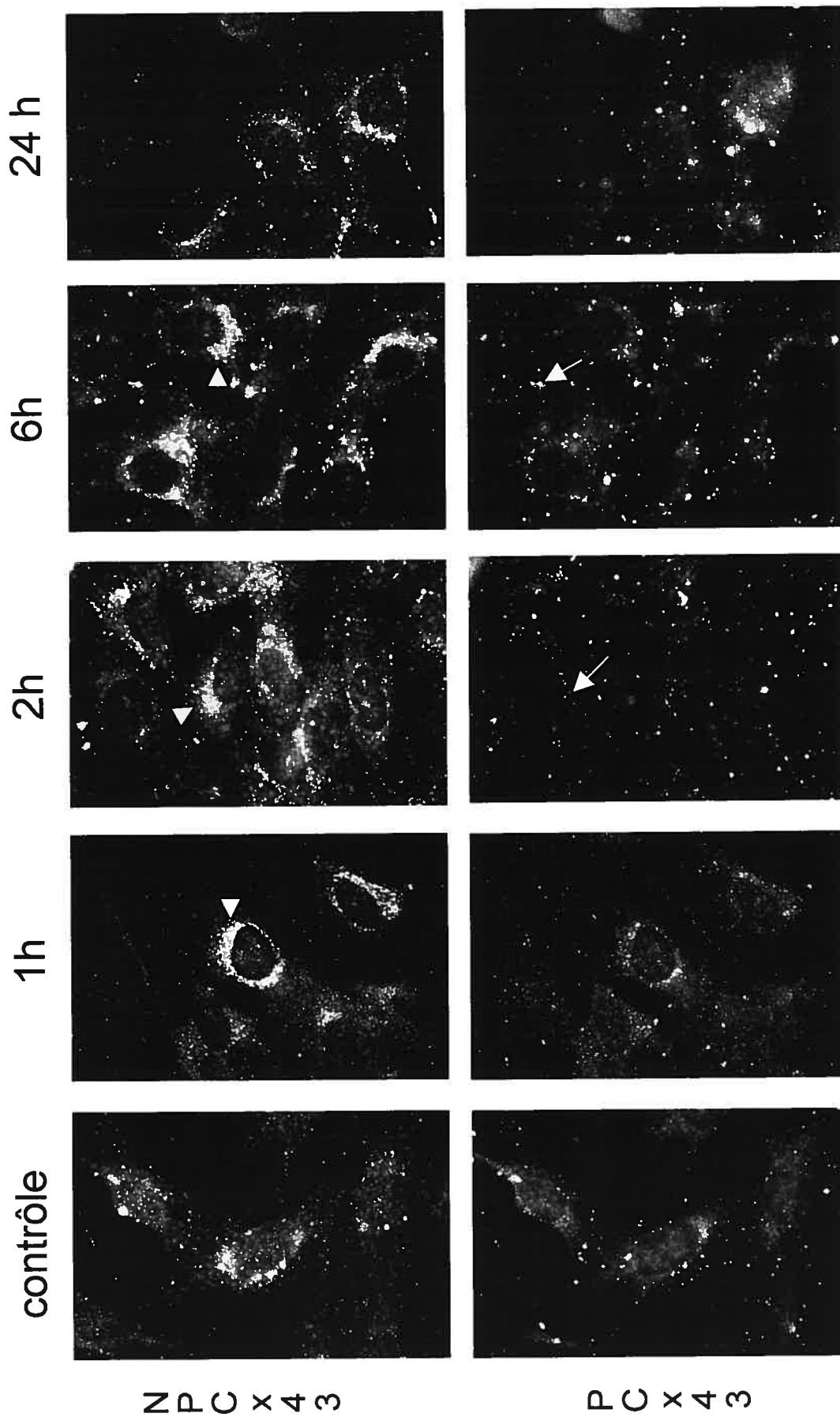


Figure 9 : Effet du $\text{TNF}\alpha$ sur le marquage et la localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 25ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ pour 0 (contrôle), 1h, 2h, 6h et 24h avant d'être doublement marquées avec les anticorps anti-NP-Cx43 et anti-P-Cx43 pour la microscopie à fluorescence. Les figures du haut représentent le marquage de la NP-Cx43. Le marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire augmente après 1 heure d'incubation au $\text{TNF}\alpha$ et se poursuit jusqu'à 6 heures d'exposition (têtes de flèche). Les figures du bas représentent le marquage de la P-Cx43. Ce marquage augmente à la membrane plasmique et dans le cytosol après 2 heures d'exposition au $\text{TNF}\alpha$ et jusqu'à 6 heures d'exposition (flèches).



NPC x 43

PC x 43

Figure 10 : Études en microscopie confocale sur l'effet de l'IL-1 β sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Nous avons incubé des cellules dans un milieu d'incubation contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont par la suite exposées à 10ng/ml d'IL-1 β pendant des périodes de 0 (contrôle), 1h, 2h, 6h et 24h. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence et marquées avec l'anticorps anti-NP-Cx43 (rouge) et avec l'anticorps P-Cx43 (vert). Le double marquage des deux anticorps (merged) indique qu'il y a de la co-localisation (jaune) entre la NP-Cx43 et la P-Cx43 à la membrane plasmique (tête de flèche) et parfois dans la région périnucléaire (flèche).

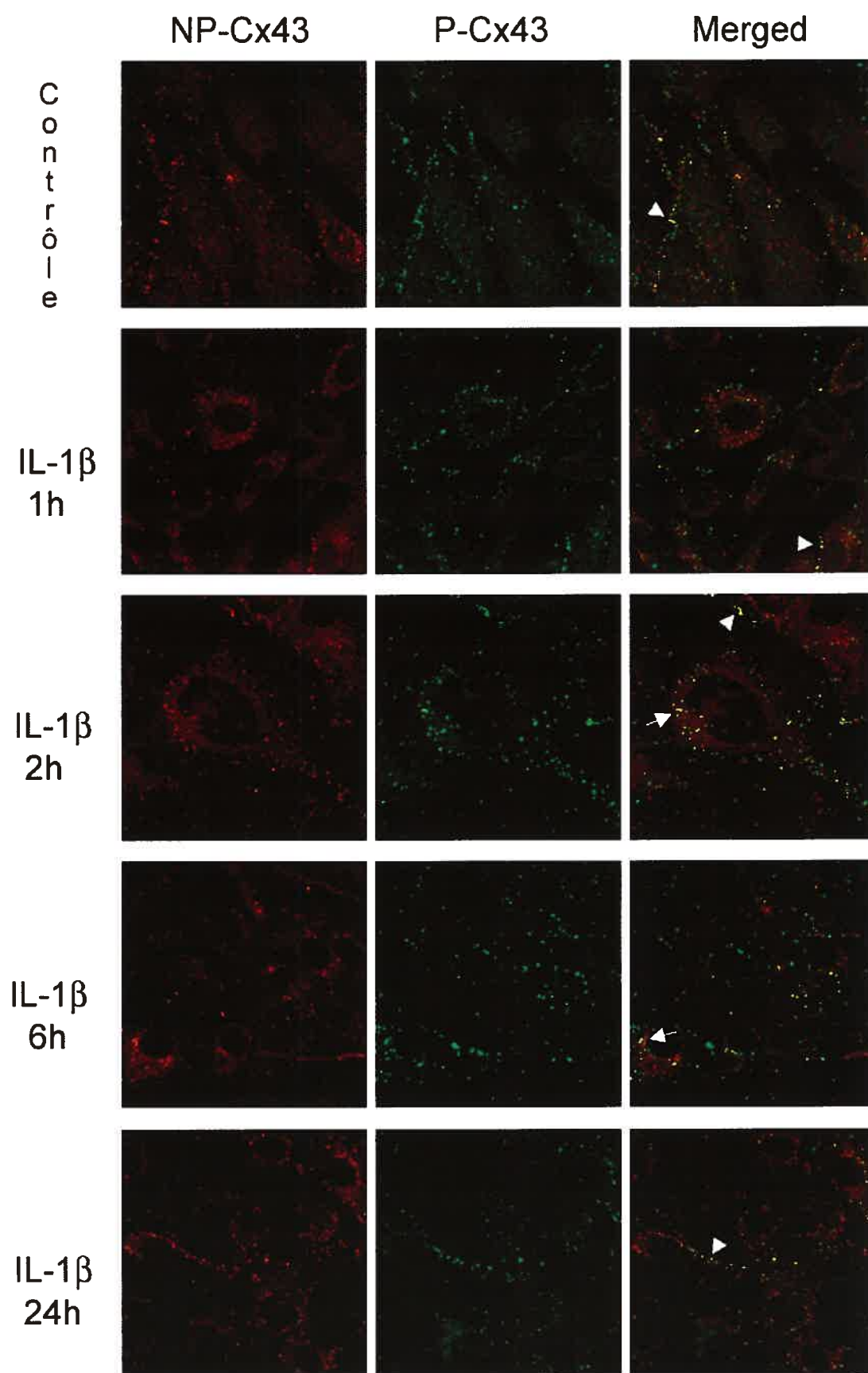


Figure 11 : Études en microscopie confocale sur l'effet du $TNF\alpha$ sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

Nous avons incubé des cellules dans un milieu d'incubation contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont par la suite exposées à 25ng/ml de $TNF\alpha$ pendant des périodes de 0 (contrôle), 1h, 2h, et 6h. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence et marquées avec l'anticorps anti-NP-Cx43 (rouge) et avec l'anticorps P-Cx43 (vert). Le double marquage des deux anticorps (merged) indique qu'il y a de la co-localisation (jaune) entre la NP-Cx43 et la P-Cx43 à la membrane plasmique (tête de flèche) et parfois dans la région périnucléaire (flèche).

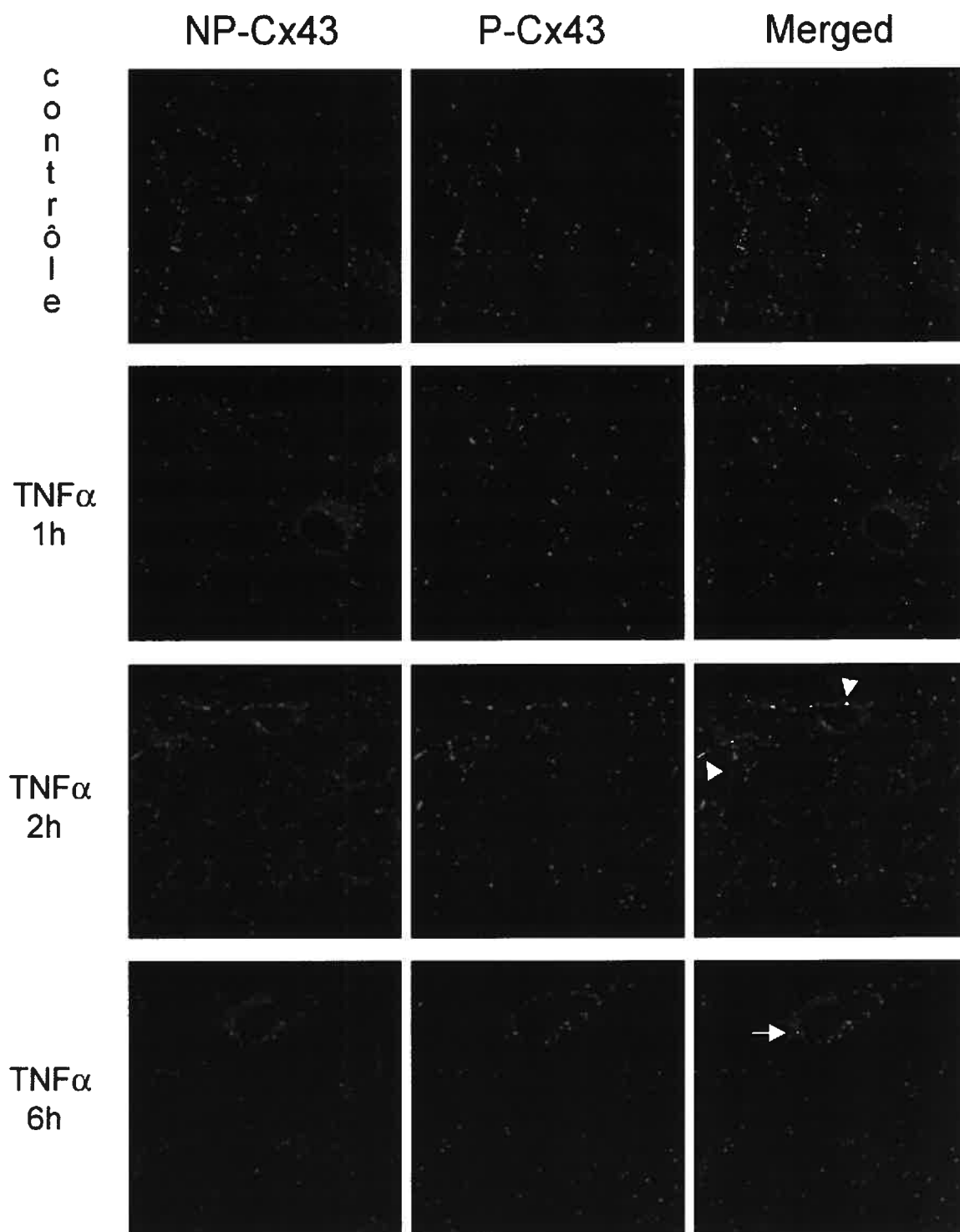


Figure 12 : Étude en microscopie confocale sur l'effet de l'IL-1 β et du TNF α sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de TGN38 dans des cellules TtT/GF.

Nous avons incubé des cellules dans un milieu d'incubation contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont par la suite exposées à 10 ng/ml d'IL-1 β pendant des périodes de 0 (contrôle) 1h et 2h ou à 25 ng/ml de TNF α pendant des périodes de 0 (contrôle) et 2h. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence et marquées avec l'anticorps anti-NP-Cx43 (rouge) et avec l'anticorps TGN38 (vert) un marqueur de *trans* Golgi. Aucune augmentation du marquage au niveau du *trans* Golgi n'est observée suite au traitement de 2 heures des cellules aux cytokines pro-inflammatoires.

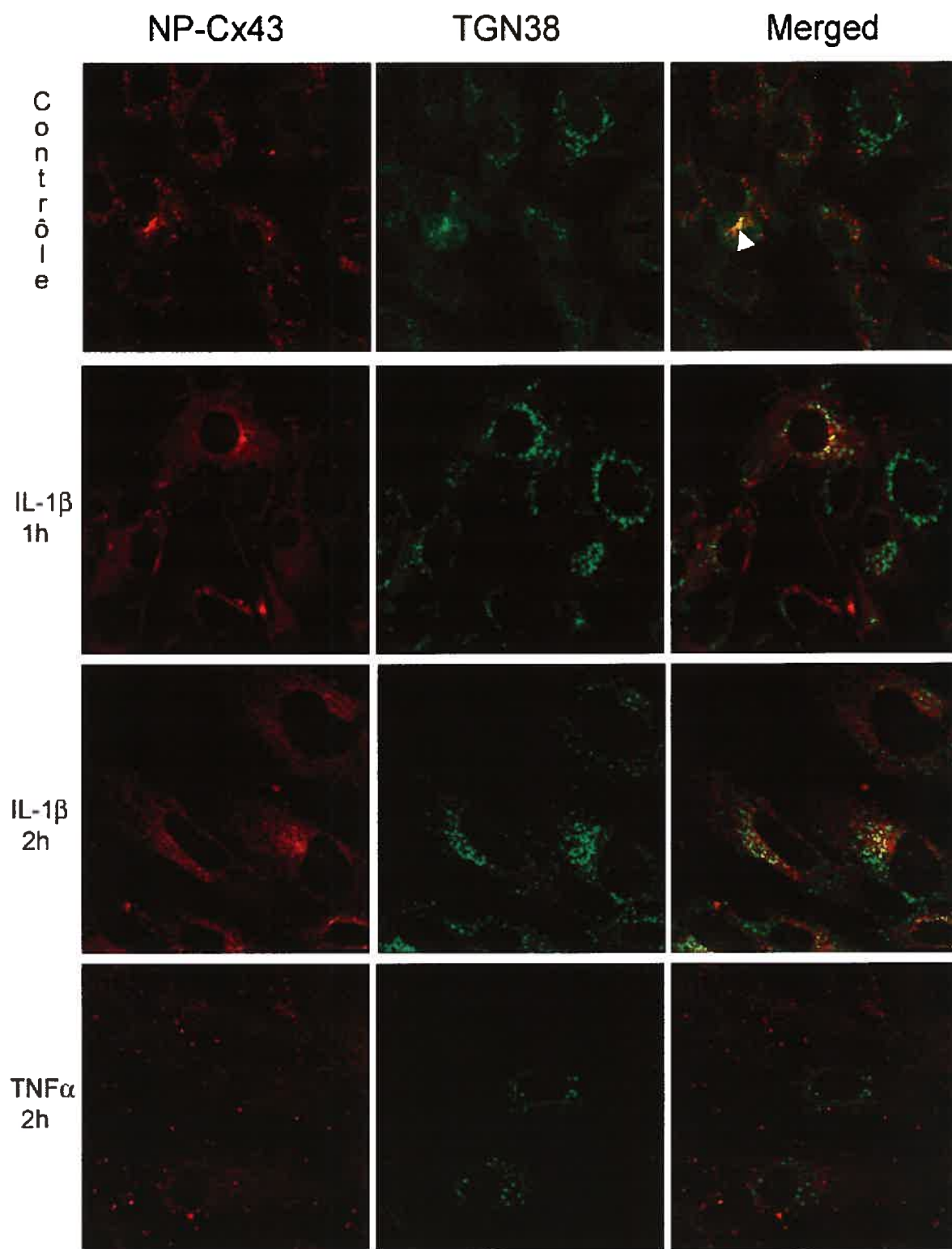


Figure 13 : Étude en microscopie confocale sur l'effet de l'IL-1 β sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de Lamp-1 dans des cellules TtT/GF.

Nous avons incubé des cellules dans un milieu d'incubation contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont par la suite exposées à 10ng/ml d'IL-1 β pendant des périodes de 0 (contrôle), 1h, 2h, 6h et 24h. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence et marquées avec l'anticorps anti-NP-Cx43 (rouge) et avec l'anticorps anti-Lamp-1 (vert) un marqueur de lysosomes. La co-localisation des deux anticorps (jaune) indique que l'exposition des cellules à l'IL-1 β augmente la co-localisation de la NP-Cx43 avec les lysosomes particulièrement après 24h d'exposition (flèches).

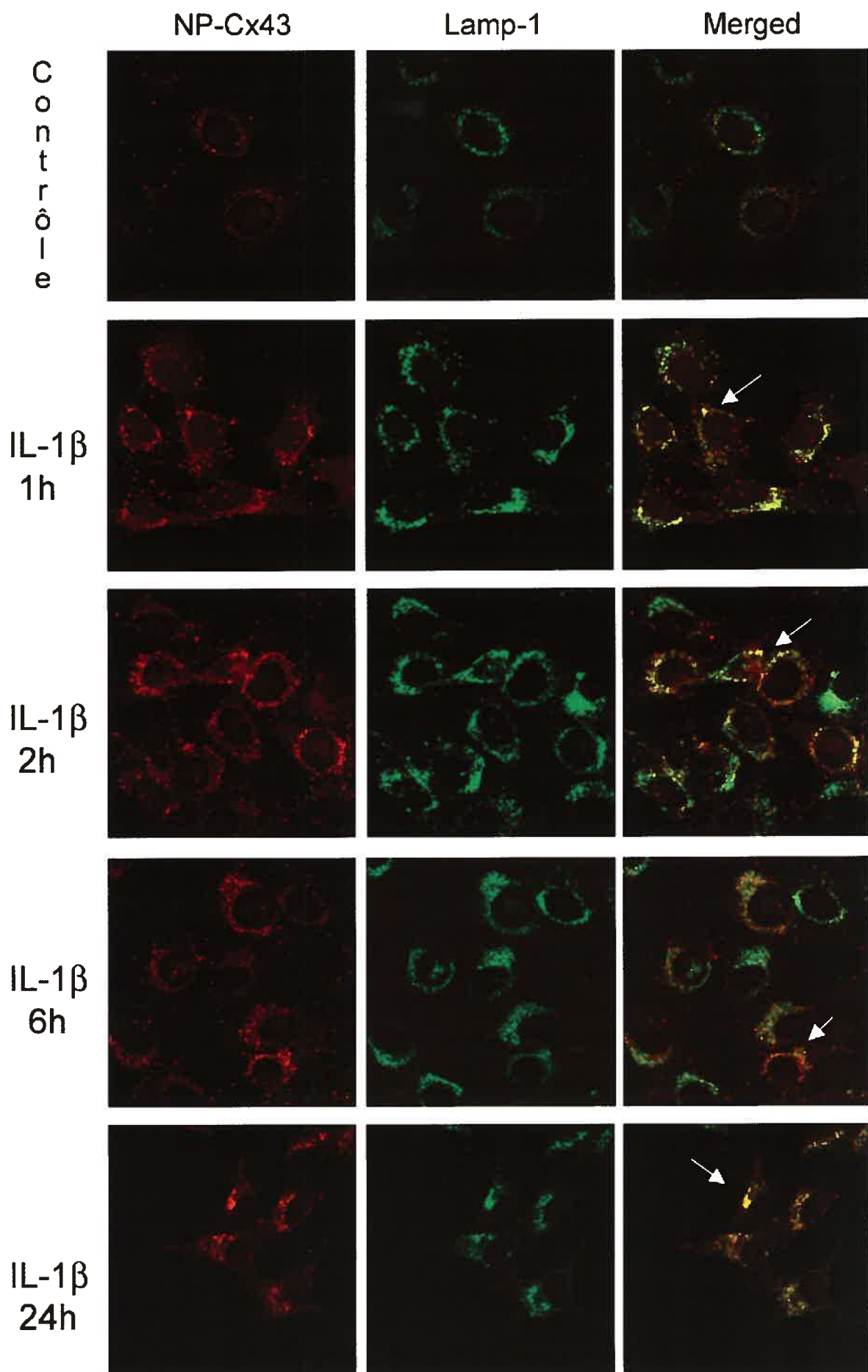


Figure 14 : Étude en microscopie confocale sur l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur la co-localisation de la NP-Cx43 et de lamp-1 dans les cellules TtT/GF.

Nous avons incubé des cellules dans un milieu d'incubation contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules sont par la suite exposées à 25ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ pendant des périodes de 0 (contrôle), 1h, 2h, 6h et 24h. Les cellules sont ensuite préparées pour la microscopie à fluorescence et marquées avec l'anticorps anti-NP-Cx43 (rouge) et avec l'anticorps anti-Lamp-1 (vert) un marqueur de lysosomes. La co-localisation des deux anticorps (jaune) indique que l'exposition des cellules au $\text{TNF}\alpha$ augmente la co-localisation de la NP-Cx43 avec les lysosomes particulièrement après 6h et 24h d'exposition (flèches).

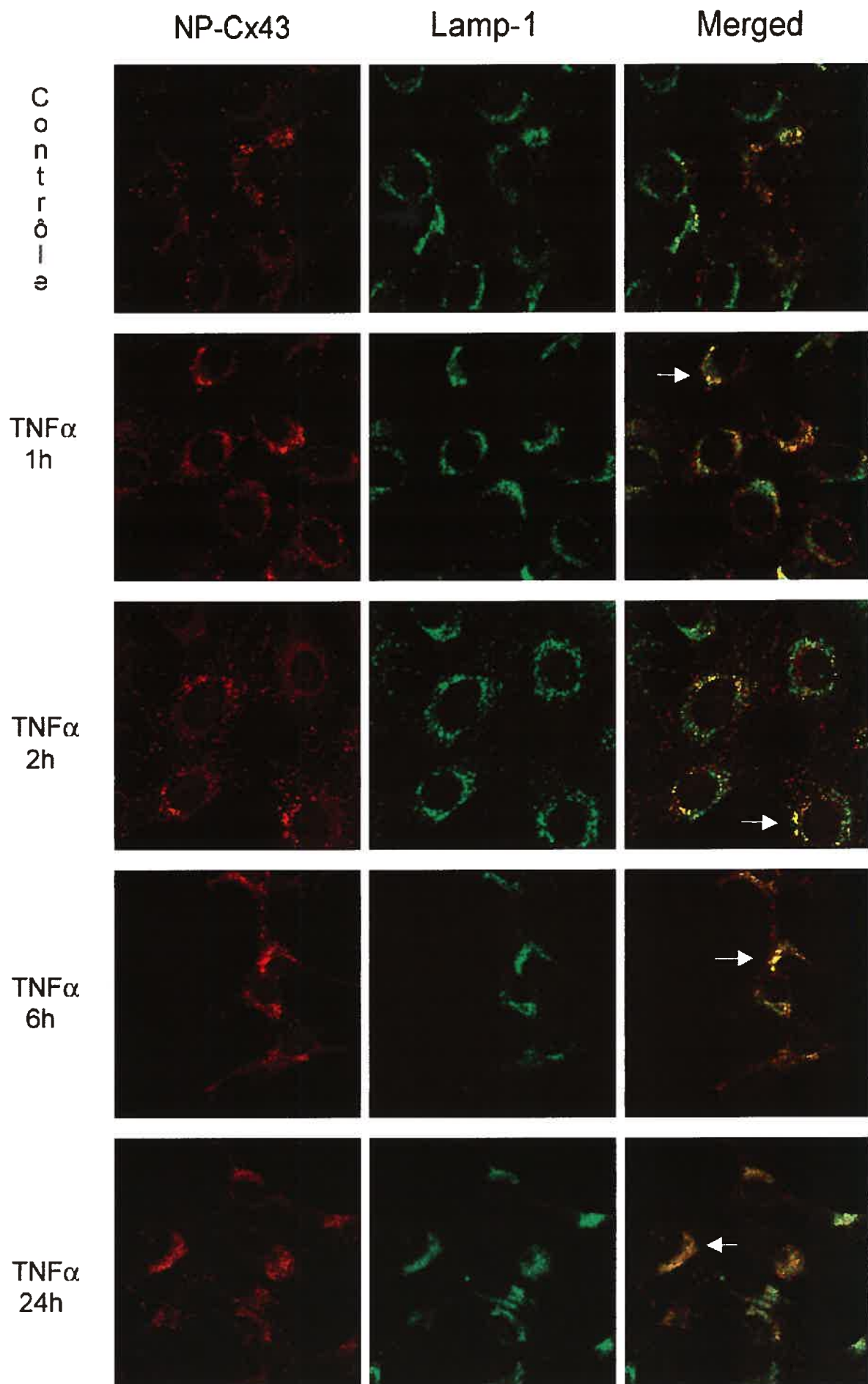


Figure 15 : Effet de la cycloheximide sur la localisation de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules ont ensuite été incubées en absence (CHX (-)) ou en présence (CHX (+)) de 20 μ g/ml de cycloheximide pendant 30 minutes avant d'être exposées ou non à 10ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/ml de TNF α pendant une période de 2 heures. Par la suite, les cellules sont préparées pour la microscopie à fluorescence et marquées avec l'anticorps anti-NP-Cx43. La présence de cycloheximide diminue le marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire. L'augmentation du marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire induite par l'IL-1 β et le TNF α est inhibée par la cycloheximide.

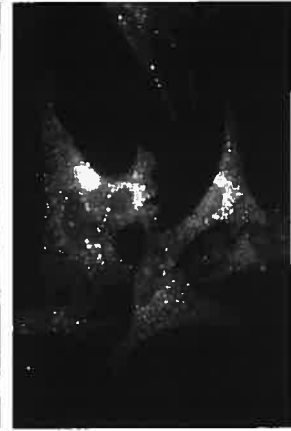
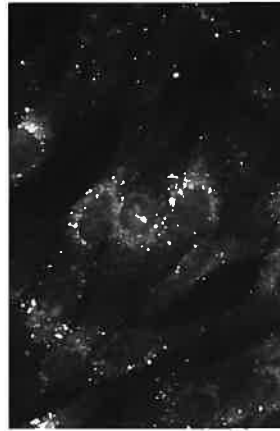
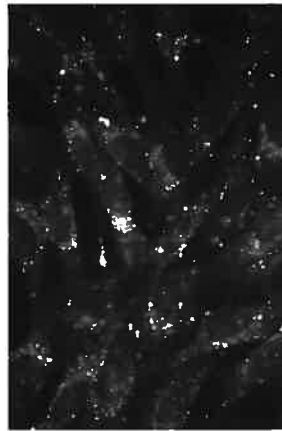
NP-Cx43

Contrôle

IL-1 β

TNF α

CHX
(-)



CHX
(+)

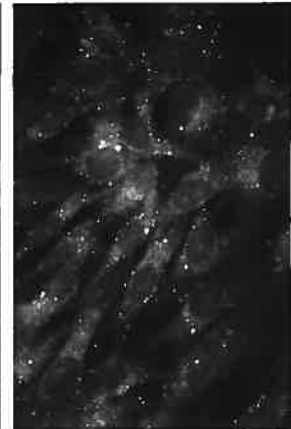
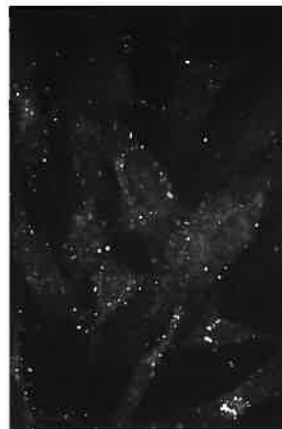


Figure 16 : Effet de la cycloheximide sur le marquage et la localisation de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules ont ensuite été incubées en absence (CHX (-)) ou en présence (CHX (+)) de 20 μ g/ml de cycloheximide pendant 30 minutes avant d'être exposées ou non à 10ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/ml de TNF α pendant une période de 2 heures. Par la suite, les cellules sont préparées pour la microscopie à fluorescence et marquées avec l'anticorps anti-P-Cx43. Le marquage de la P-Cx43 dans les cellules contrôle CHX (+) est plus faible à la membrane plasmique que dans les cellules contrôle CHX (-). Par contre, le niveau d'expression de la P-Cx43 ne diminue pas après l'exposition des cellules à l'IL-1 β ou au TNF α .

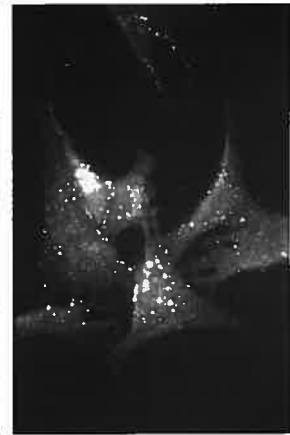
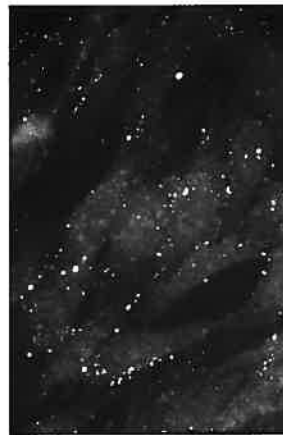
P-Cx43

Contrôle

IL-1 β

TNF α

CHX
(-)



CHX
(+)

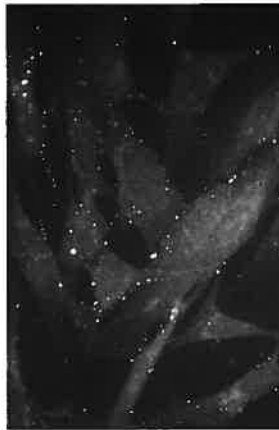
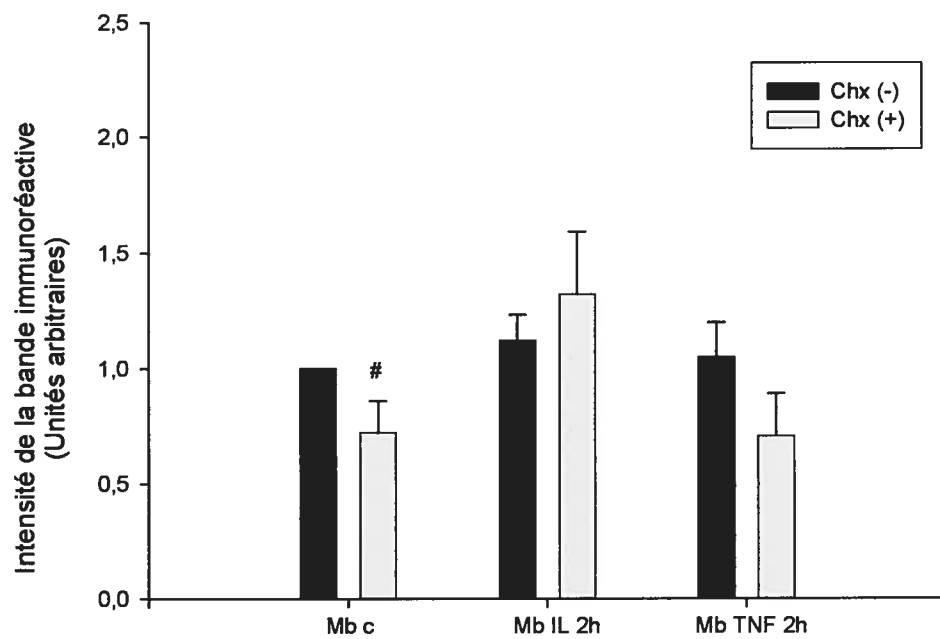


Figure 17 : Effet de la cycloheximide sur l'expression de la NP-Cx43 dans des fractions membranaires et cytosoliques de cellules TtT/GF.

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules ont ensuite été incubées en absence (CHX (-)) ou en présence (CHX (+)) de 20 μ g/ml de cycloheximide pendant 30 minutes avant d'être traitées ou non avec 10ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/ml de TNF α pendant une période de 2 heures. Par la suite, les cellules sont récupérées et séparées en fractions membranaires et cytosoliques qui sont préparées pour l'immunobuvardage. L'intensité des bandes correspondant à la NP-Cx43 dans chacune des conditions a été mesurée par densitométrie pour obtenir un graphique. Nous avons déterminé l'intensité de la bande des cellules contrôle comme étant égale à 1. Chacune des valeurs du graphique provient d'au moins 3 expériences. Les résultats démontrent que dans les fractions membranaires Mbc CHX (+), la présence de cycloheximide diminue l'expression de la NP-Cx43 par rapport au contrôle Mbc chx (-) (#, $P < 0.02$). La présence d'IL-1 β ou de TNF α empêche la diminution induite par la cycloheximide dans les fractions membranaires. Dans les fractions cytosoliques de cellules contrôle (Cic), la cycloheximide ne diminue pas significativement l'expression de la NP-Cx43 mais cette diminution est significative en présence d'IL-1 β (##, $P < 0.05$) et de TNF α (**, $P < 0.00005$).

NP-Cx43

Fractions membranaires



NP-Cx43

Fractions cytosoliques

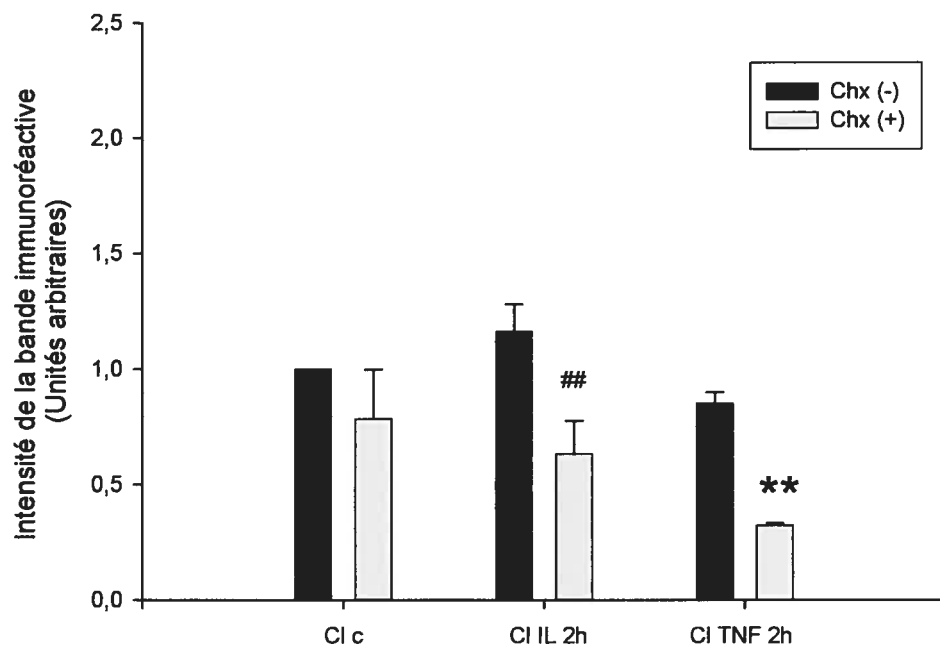
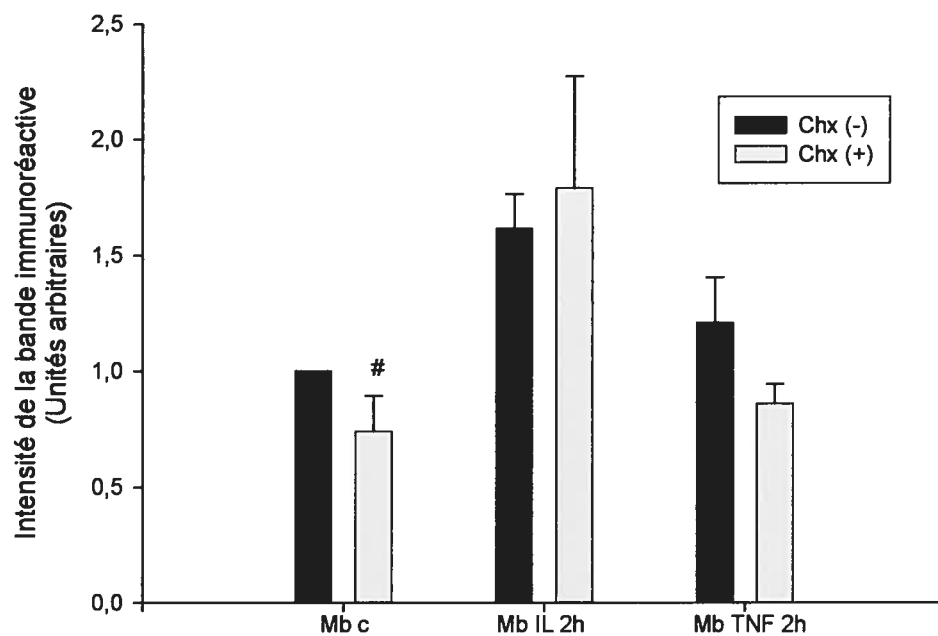


Figure 18 : Effet de la cycloheximide sur l'expression de la P-Cx43 dans des fractions membranaires et cytosoliques de cellules TtT/GF.

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Les cellules ont ensuite été incubées en absence (CHX (-)) ou en présence (CHX (+)) de 20µg/ml de cycloheximide pendant 30 minutes avant d'être traitées ou non avec 10ng/ml d'IL-1β ou 25 ng/ml de TNFα pendant une période de 2 heures. Par la suite, les cellules sont récupérées et séparées en fractions membranaires et cytosoliques qui sont préparées pour l'immunobuvardage. L'intensité des bandes correspondant à la P-Cx43 dans chacune des conditions a été mesurée par densitométrie pour obtenir un graphique. Nous avons déterminé l'intensité de la bande des cellules contrôle comme étant égale à 1. Chacune des valeurs du graphique provient d'au moins 3 expériences. Dans les fractions membranaires des cellules contrôle (Mb C), la présence de cycloheximide diminue l'expression de la P-Cx43 (#, $P < 0.05$) mais la présence d'IL-1β ou de TNFα empêche cette inhibition. Dans les fractions cytosoliques (Cl), la cycloheximide diminue l'expression de la P-Cx43 dans les cellules contrôles (#, $P < 0.005$) et les cellules traitées au TNFα (##, $P < 0.005$).

P-Cx43

Fractions membranaires



P-Cx43

Fractions cytosoliques

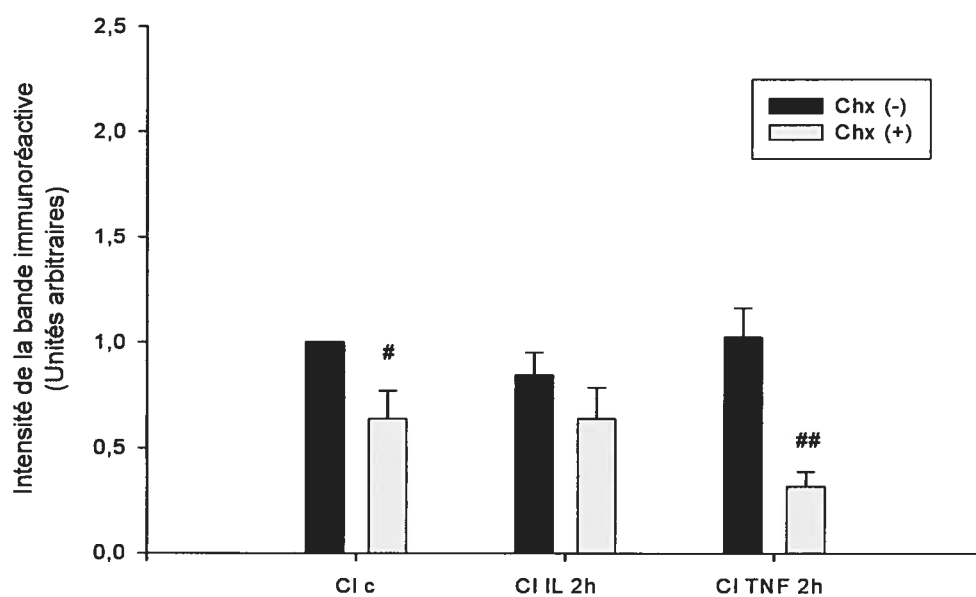


Figure 19 : Effet de la leupeptine sur la localisation de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Nous avons incubé des cellules en absence ou en présence de 100 μ M de leupeptine pendant une période de 30 minutes avant de les exposer ou non pendant 2 heures aux cytokines IL-1 β ou TNF α . Nous avons ensuite préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et nous avons marqué les cellules avec des anticorps anti-NP-Cx43 et anti-Lamp-1. La comparaison du marquage dans les cellules contrôle Leup (-) et Leup (+) permet de constater que l'intensité du marquage de la NP-Cx43 de même que sa localisation ne changent pas en présence de leupeptine. La leupeptine ne modifie pas l'augmentation de l'intensité du marquage de la NP-Cx43 induite par les cytokines IL-1 β ou TNF α dans la région périnucléaire. Par contre, en présence des cytokines, on remarque que l'intensité du marquage de la NP-Cx43 au niveau de la membrane aux contacts cellulaires augmente (NP-Cx43, IL-1 β et TNF α , Leup (+), flèches). Le double marquage effectué avec la protéine lamp-1 suggère une co-localisation partielle de la NP-Cx43 au niveau des lysosomes.

Contrôle

IL-1 β

TNF α

NP-Cx43

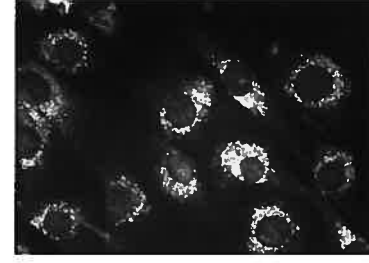
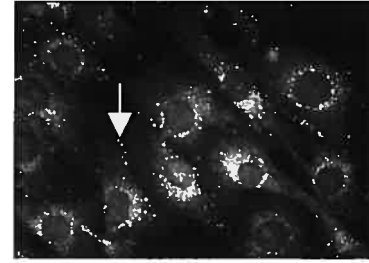
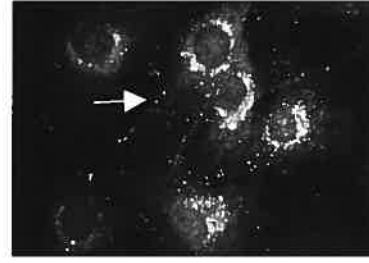
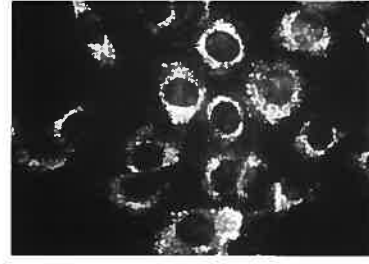
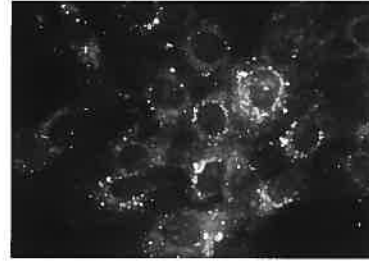
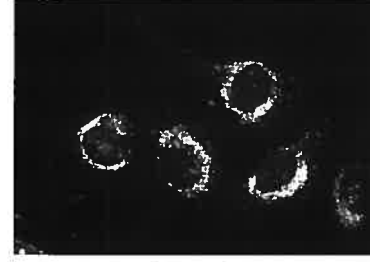
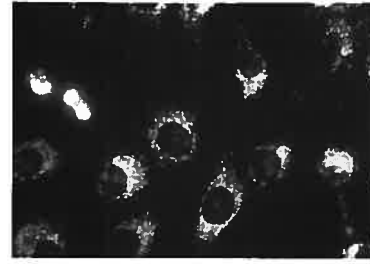
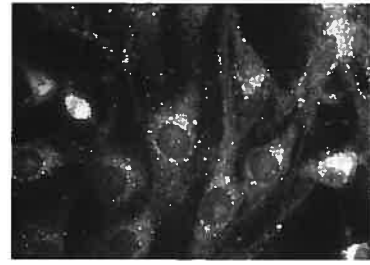
Lamp-1

NP-Cx43

Lamp-1

NP-Cx43

Lamp-1



Leup
(-)

Leup
(+)

Figure 20 : Effet de la leupeptine sur la localisation de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Nous avons incubé des cellules TtT/GF en absence ou en présence de 100 μ M de leupeptine pendant une période de 30 minutes avant de les exposer ou non pendant 2 heures à 10 ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/ml de TNF α . Nous avons ensuite préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et nous avons marqué les cellules avec l'anticorps anti-P-Cx43. Les résultats du marquage de la P-Cx43 démontrent que la leupeptine augmente l'intensité du marquage de la P-Cx43 à la membrane plasmique par rapport aux cellules contrôle Leup (-) et IL-1 β Leup (-) (flèches). Dans les cellules incubées en présence de TNF α , cette augmentation à la membrane plasmique est moins évidente.

P-Cx43

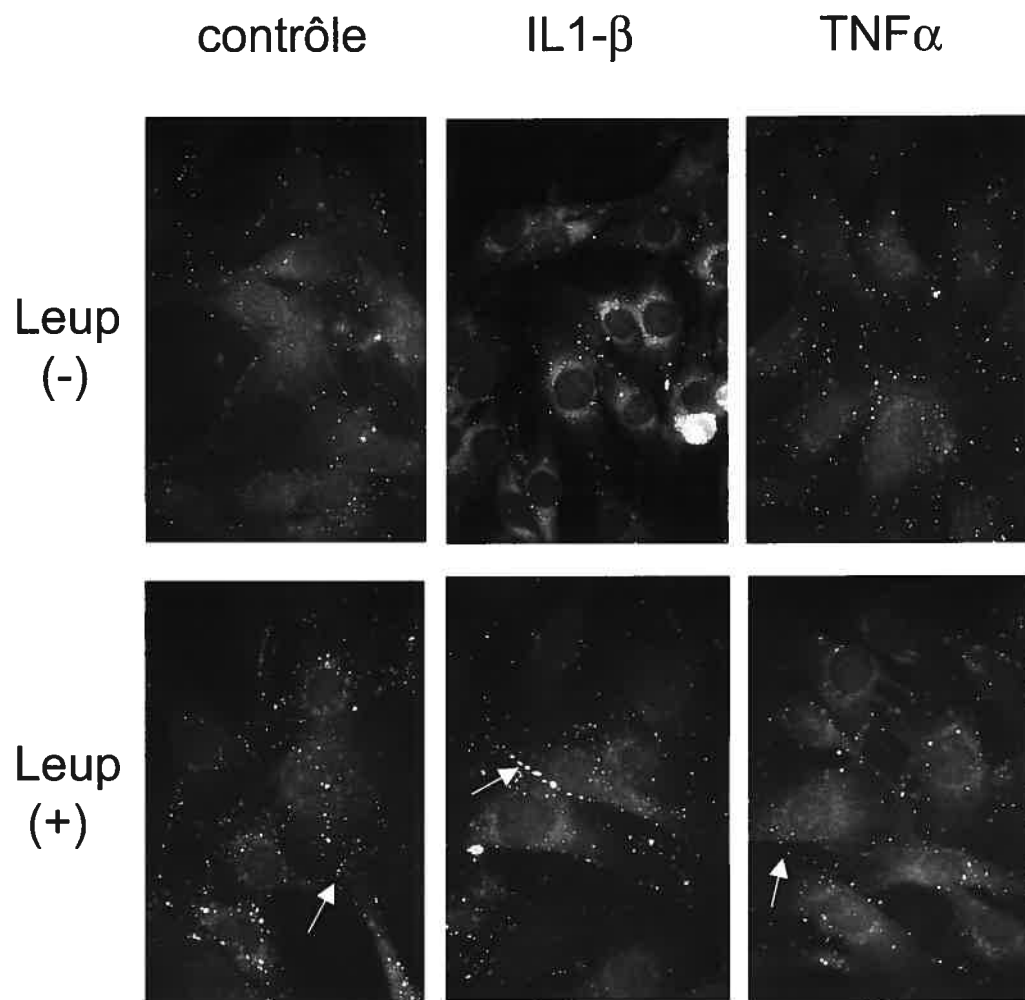


Figure 21 : Effet de la lactacystine sur la localisation de la NP-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Nous avons ensuite incubé les cellules en présence ou en absence de 15 μ M de lactacystine pendant 30 minutes avant d'incuber les cellules en présence ou en absence de 10 ng/ml d'IL-1 β ou de 25 ng/ml de TNF α . Nous avons ensuite préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et effectué un marquage avec les anticorps anti-NP-Cx43 et anti-lamp-1. Dans les cellules incubées en présence de lactacystine (Lac (+)), il semble avoir très peu de changements au niveau de la localisation de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire par rapport aux cellules Lac (-). La présence de cytokines n'a pas non plus d'influence sur la localisation et l'expression de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire en présence de lactacystine. Une accumulation de la NP-Cx43 à la membrane plasmique est observée dans les cellules contrôle Lac (+) (figure 21, NP-Cx43, Lac (+), flèche). Par contre, en présence des cytokines, les cellules Lac (+) ne présentent pas d'accumulation de NP-Cx43 à la membrane plasmique par rapport aux cellules Lac (-). Le double marquage effectué avec la protéine lamp-1 suggère une co-localisation partielle de la NP-Cx43 au niveau des lysosomes.

Contrôle

IL-1 β

TNF α

NP-Cx43

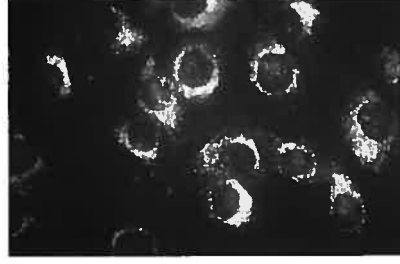
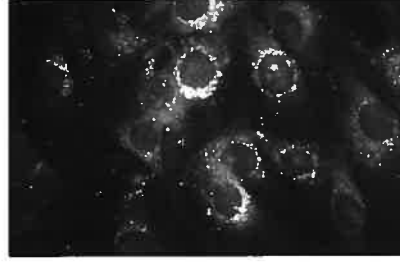
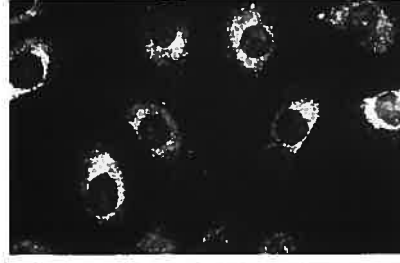
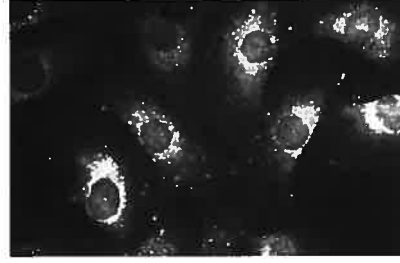
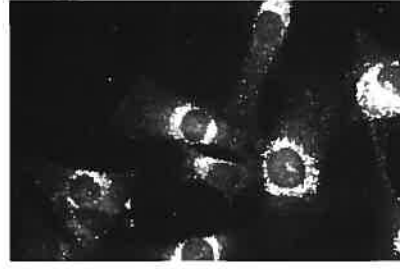
Lamp-1

NP-Cx43

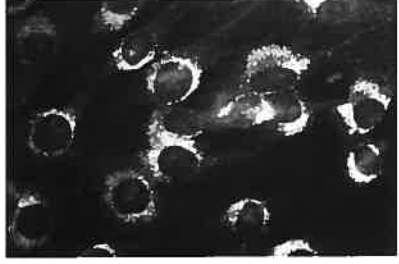
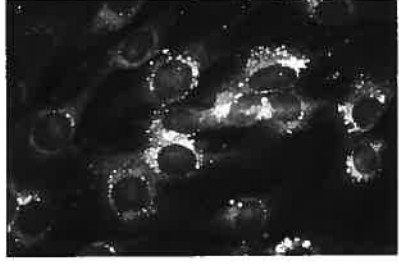
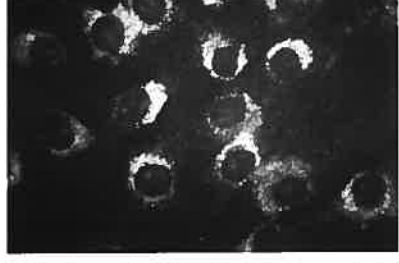
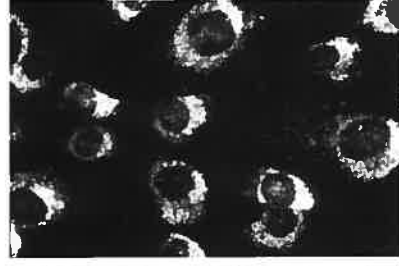
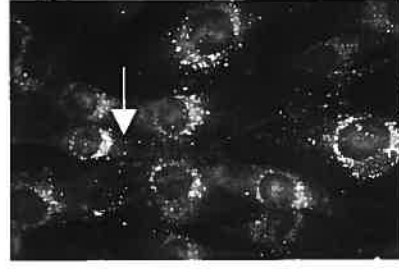
Lamp-1

NP-Cx43

Lamp-1



Lac
(-)



Lac
(+)

Figure 22 : Effet de la lactacystine sur la localisation de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF traitées ou non avec l'IL-1 β ou le TNF α .

Les cellules TtT/GF ont été incubées dans un milieu contenant 5% de sérum pendant quatre jours. Nous avons ensuite incubé les cellules en présence ou en absence de 15 μ M de lactacystine pendant 30 minutes avant d'incuber les cellules en présence ou en absence de 10 ng/ml d'IL-1 β ou de 25 ng/ml de TNF α . Nous avons ensuite préparé les cellules pour la microscopie à fluorescence et effectué un marquage avec l'anticorps anti-P-Cx43. Les résultats sur le marquage de la P-Cx43 sur les cellules contrôle en présence ou en absence de lactacystine démontrent une augmentation de l'intensité du marquage de la P-Cx43 à la membrane plasmique dans les cellules contrôle Lac (+) par rapport aux cellules contrôle Lac (-). L'augmentation de l'expression de la P-Cx43 à la membrane plasmique en présence de lactacystine est aussi observée dans les cellules IL-1 β Lac (+) et TNF α Lac (+) par rapport aux cellules IL-1 β Lac (-) et TNF α Lac (-).

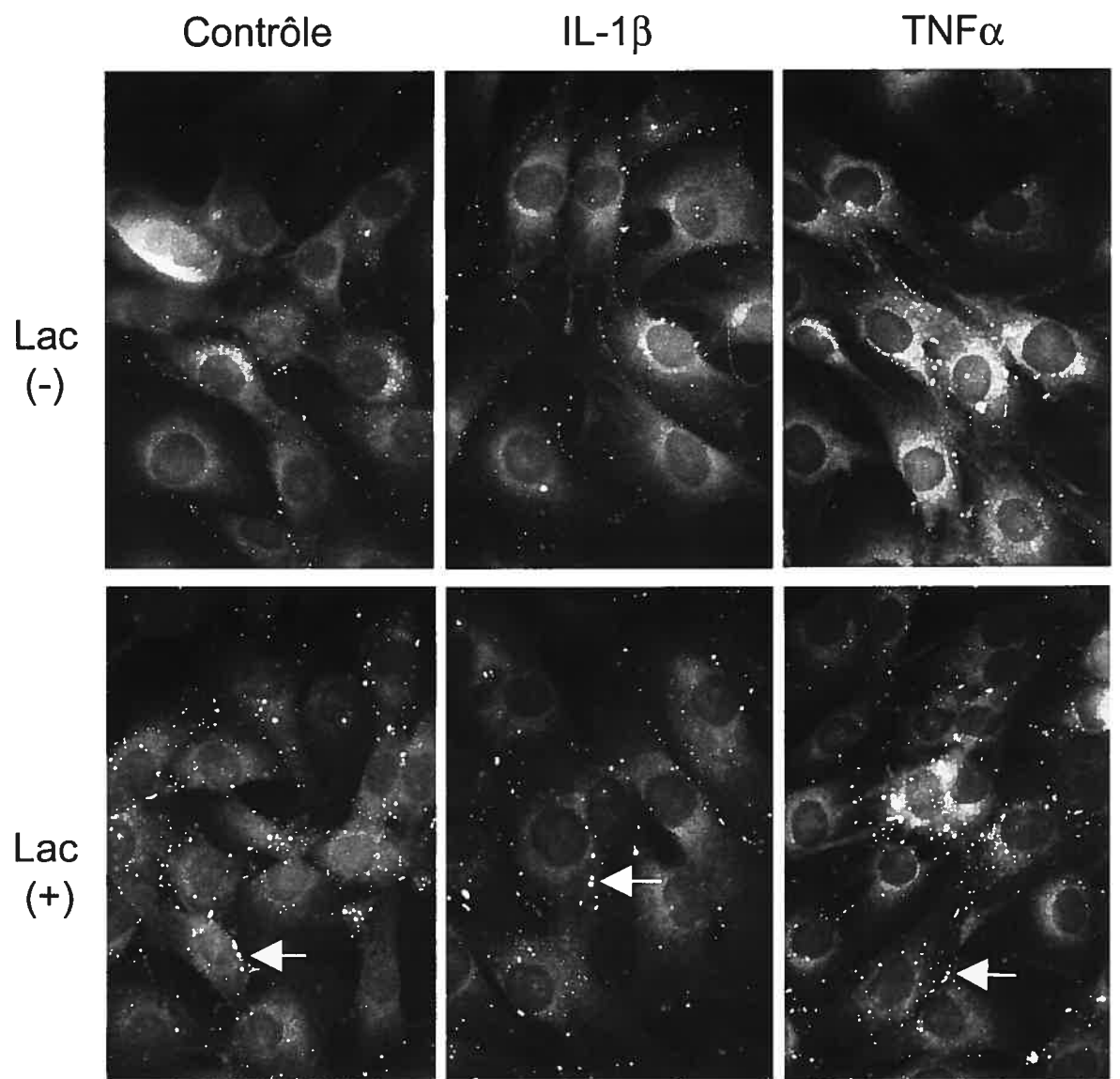


Figure 23 : Effet de l'IL-1 β et du TNF α sur la communication intercellulaire des cellules TtT/GF.

Nous avons incubé les cellules dans un milieu d'incubation contenant 5% de sérum pendant 4 jours. Les cellules sont ensuite exposées ou non à 10ng/ml d'IL-1 β ou 25 ng/ml de TNF α pendant une période de 2 heures. Après l'exposition, nous avons effectué trois rayures parallèles sur la lamelle avec une aiguille et nous avons incubé les cellules en présence de 0.5mM de calcéine à 4°C pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite fixées à la formaldéhyde puis préparées pour la microscopie à fluorescence. Les résultats démontrent qu'en absence de cytokines, les cellules brisées de même que quelques rangées de cellules ont reçu la calcéine (A, flèche). En présence d'IL-1 β (B) ou de TNF α (C), la calcéine diffuse par les jonctions gaps jusqu'à des cellules plus éloignées par rapport au contrôle (flèches).

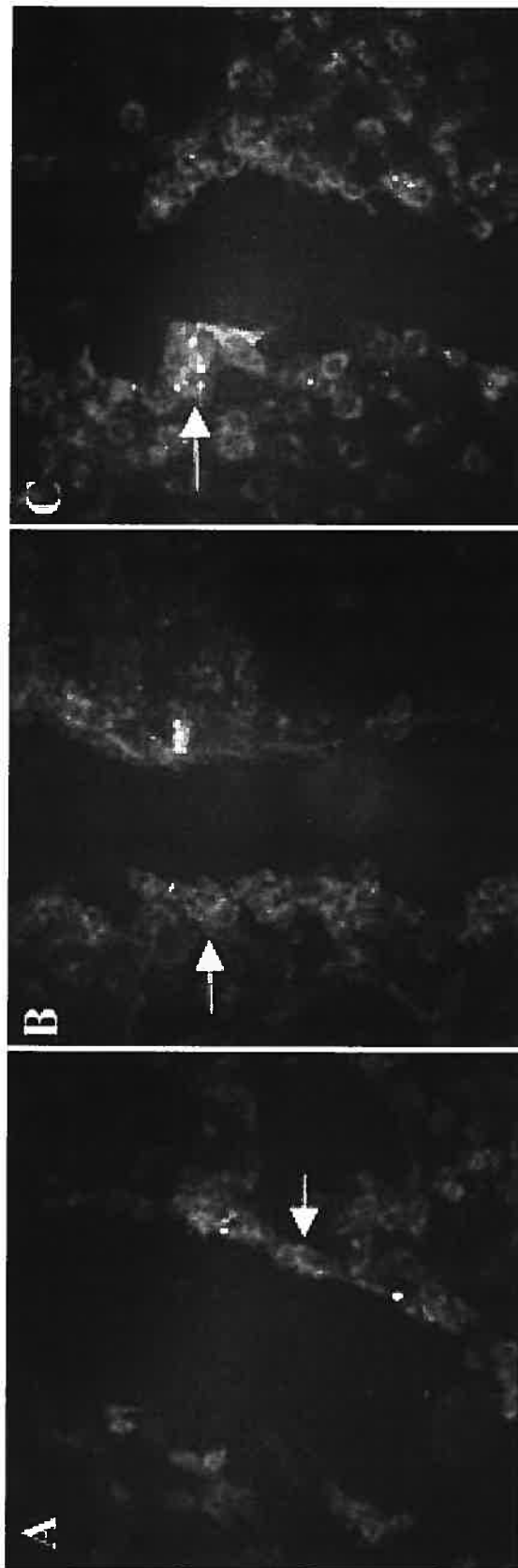


Figure 24 : Variation de l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans l'hypophyse antérieure du vison durant le cycle annuel reproductif.

Nous avons recueillie des hypophyses de vison mâles pendant la dernière semaine du mois de février, mai et août et nous avons vérifié l'expression de la NP-Cx43 (A) et de la P-Cx43 (B) pour chacun de ces mois par immunobuvardage. Les résultats démontrent que l'expression de la NP-Cx43 est très faible en février et qu'elle augmente en mai et en août. L'expression de la P-Cx43 est aussi faible en février et augmente en mai et en août. Les immunobuvardages de la P-Cx43 en mai et août suggèrent la présence d'une bande d'un poids moléculaire plus élevé (B, flèche).

NP-Cx43



Fév Mai Août

P-Cx43



Fév Mai Août

4. DISCUSSION

Il existe une étroite relation entre le système endocrinien et le système immunitaire chez les mammifères (Renner et col. 1998). Les cytokines sont capables de moduler la sécrétion des cellules endocriniennes et, en retour, les hormones peuvent induire la production de cytokines par les cellules du système immunitaire. Toutes les cellules de l'hypophyse antérieure possèdent des récepteurs à cytokines (Kariagina et col., 2004). De plus, les cellules FS lient et sécrètent des cytokines et autres molécules capables de moduler de façon paracrine la sécrétion des cellules endocrines de l'hypophyse antérieure (Schwartz, 2000). Aussi, les cellules FS sont reliées entre elles par des jonctions gap composées de Cx43 formant ainsi un réseau de communication en trois dimension à l'intérieur de la glande (Fauquier et col., 2002). Notre laboratoire a démontré que durant le cycle annuel reproductif du vison, il existe une relation entre l'expression de la Cx43 dans l'hypophyse antérieure et la sécrétion de prolactine (Vitale et col., 2001). Dans la présente étude, nous avons démontré que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α modulent l'expression et la localisation de la Cx43 dans les cellules TtT/GF, une lignée de cellules FS. Cette modulation de la Cx43 implique une modification de la communication intercellulaire entre les cellules TtT/GF. Les cellules FS seraient donc en mesure d'établir une synchronisation de la sécrétion des hormones hypophysaires durant la réaction inflammatoire.

4.1. CARACTÉRISATION GÉNÉRALE DE LA Cx43 DANS LES CELLULES TtT/GF

A) Expression et localisation de la Cx43 dans les cellules TtT/GF

Nous avons utilisé la lignée cellulaire TtT/GF comme modèle expérimental car cette lignée est reconnue pour ses caractéristiques similaires à celles des cellules FS de l'hypophyse antérieure (Inoue et col., 1992). Nos résultats indiquent que les cellules TtT/GF expriment, tout comme les cellules FS, la Cx43 et que les cellules TtT/GF sont en mesure de former entre elles des jonctions gap fonctionnelles. Nos résultats en immunobuvardage indiquent que dans les cellules TtT/GF la Cx43 se trouve sous sa forme non-phosphorylée (NP) et sous les formes mono- (1P) et di- (2P) phosphorylées. Lorsque l'on observe en microscopie à fluorescence la localisation générale de la Cx43 (Pan-Cx43), nos résultats indiquent la présence de Cx43 1) dans le cytoplasme, particulièrement dans la région périnucléaire, 2) sur la membrane plasmique aux contacts cellulaires, 3) sur la membrane plasmique en dehors des contacts cellulaires (hémicanaux).

En utilisant un anticorps qui ne reconnaît que la Cx43 non phosphorylée en sérine 368 (NP-Cx43) nous avons démontré que cette forme est principalement localisée dans la région périnucléaire. La NP-Cx43 est aussi localisée à la membrane plasmique aux contacts cellulaires et également sous forme d'hémicanaux libres à la membrane plasmique. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de la Cx43 n'est pas requise pour la migration de la Cx43 à la membrane plasmique. Toutefois, l'anticorps NP-Cx43 n'exclue pas une phosphorylation ailleurs sur le segment C-terminal cytosolique de la Cx43. C'est pourquoi nous pouvons affirmer que la

phosphorylation de la sérine 368 de la Cx43 n'est pas une étape essentielle à la migration de la protéine vers la membrane plasmique. L'anticorps utilisé contre la Cx43 non phosphorylée en sérine 368 (NP-Cx43) peut correspondre en partie à une Cx43 phosphorylée sur un autre site de phosphorylation de la protéine. Cette possibilité pourrait aussi expliquer la présence de la NP-Cx43 à la membrane plasmique. La sérine 368 de la Cx43 est reconnue pour être la principale cible de la PKC (Lampe et col., 2000, Bao et col., 2003). Une étude a démontré que la phosphorylation sur la sérine 364 par la PKA est nécessaire pour permettre à la PKC d'effectuer d'autres phosphorylations sur la Cx43 (Shah et col., 2002). Toutefois la PKC serait en mesure, mais à un degré moindre, de phosphoryler la Cx43 même s'il n'a pas de phosphorylation ailleurs sur la protéine (Shah et col., 2002). La présence de NP-Cx43 à la membrane plasmique pourrait donc correspondre à une Cx43 dépourvue de phosphorylation ou ayant une phosphorylation sur un autre site ailleurs sur la partie C-terminale de la protéine.

Quant à la Cx43 phosphorylée en sérine 368 (P-Cx43), celle-ci est localisée en majorité à la membrane plasmique et légèrement dans la région périnucléaire. Notons que la P-Cx43 se retrouve aux contacts cellulaires mais qu'elle est également localisée en dehors des contacts cellulaires sous forme d'hémicannaux.

Puisque les formes NP-Cx43 et P-Cx43 se retrouvent toutes deux à la membrane plasmique, il est possible que les hémicannaux et les jonctions gap à la surface des cellules présentent différentes conductances. La mutation de la sérine 368 empêche la diminution de la conductance de la Cx43 induite par des esters phorbols

comme le TPA, un activateur de la PKC (Lampe et col., 2000). La présence de la sérine 368 est requise pour favoriser la diminution de la conductance de la Cx43 mais sa phosphorylation n'entraîne pas automatiquement une diminution de la communication intercellulaire. L'assemblage des connexons en jonction gap, la phosphorylation de la Cx43 sur d'autres sites de phosphorylation et la dégradation des connexines sont également des mécanismes qui modulent la conductance des jonctions gap (Lampe et col., 2000).

B) Influence des facteurs sériques sur l'expression de la Pan-Cx43

L'incubation des cellules en absence de sérum permet d'étudier l'impact de facteurs sériques sur l'expression et la localisation de la Cx43. Les résultats démontrent que même si l'absence de sérum provoque un changement dans la forme cellulaire, l'absence de sérum n'a pas d'influence sur la localisation de la Cx43. La Cx43 se retrouve encore dans la région périnucléaire et à la membrane plasmique. La localisation de la Cx43 à la membrane plasmique se situe principalement aux contacts cellulaires. Par contre, la quantité de Cx43 associée à la région périnucléaire chute par rapport aux cellules incubées en présence de sérum. Cette diminution de marquage de la Pan-Cx43 dans la région périnucléaire peut être le résultat de la diminution de la synthèse de la Cx43 occasionnée par le manque de sérum combiné à la dégradation de la protéine par la voie des lysosomes ou des protéasomes. L'absence de sérum n'est toutefois pas en mesure de diminuer la présence de la Cx43 à la membrane plasmique lorsqu'il y a contact cellulaire. Tous ces résultats semblent démontrer que l'absence de sérum provoque une réduction de la transcription des protéines ce qui inclut la Cx43. La stimulation de la synthèse ou l'inhibition de la dégradation sont des

mécanismes que la cellule utilise souvent pour prolonger la demie-vie de ses protéines. La persistance de la Cx43 à la membrane plasmique en absence de sérum pourrait indiquer qu'une partie de la Cx43 dans la région périnucléaire a migré vers la membrane plasmique. Il se peut également que le stress induit par l'absence de sérum augmente la stabilité de l'ARNm de la Cx43 ou encore la stabilité de la protéine à la membrane empêchant ainsi sa dégradation. Des études ont prouvé que la mutation de la tyrosine 286 de la Cx43 (faisant partie d'un motif riche en résidus tyrosine et proline sur la partie C-terminale de la protéine) prolongeait la demie-vie de la protéine en empêchant son internalisation et sa dégradation par les lysosomes ou les protéasomes (Thomas et col., 2003). Il est possible que l'absence de sérum empêche les jonctions gap formées de Cx43 d'être ciblées et dégradées par les voies de dégradation des lysosomes et des protéasomes.

Le double marquage de la Pan-Cx43 avec les filaments d'actine indique que la Cx43 à la membrane plasmique se retrouve aux extrémités des prolongements cytoplasmiques des cellules TtT/GF. De plus, si l'on compare les filaments d'actine en présence et en absence de sérum, on peut noter que les filaments d'actine sont plus épais en absence de sérum. Des recherches ont révélé que la déstabilisation de l'actine par l'utilisation d'anticorps contre l'actine provoque une diminution de la communication intercellulaire et une diminution de la translocation de la Cx43 du Golgi vers la membrane plasmique (Theiss et Meller, 2002). De plus, il est possible que des protéines de liaison à l'actine interviennent dans la stabilisation de la Cx43 à la membrane plasmique. Par exemple la debrine, une protéine de liaison à l'actine, possède un domaine de liaison avec la partie C-terminale cytosolique de la Cx43

(Butkevich et col., 2004). Une inhibition de la traduction de debrine occasionne une perturbation du couplage des connexons en jonction, de l'internalisation des jonctions et de la dégradation de la Cx43 (Butkevich et col., 2004). Il est possible que la stabilisation des filaments d'actine et des protéines qui interagissent avec la Cx43 provoque la translocation de la Cx43 vers la membrane plasmique et la stabilisation de la Cx43 à la membrane. Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi la Cx43 dans la région périnucléaire diminue alors que la présence de la Cx43 reste stable à la membrane plasmique en absence de sérum.

C) Localisation subcellulaire de la Cx43 dans les cellules TtT/GF

L'étude du fractionnement subcellulaire de cellules TtT/GF cultivées en présence de sérum indique que la majeure partie du marqueur des lysosomes, lamp-1, se retrouve dans la fraction lysosomiale. Toutefois, une petite proportion de lamp-1 est associée à la fraction golgienne. Le marqueur du réticulum endoplasmique, la calnexine, est associé à toutes les fractions ce qui indique que des microsomes originaires du réticulum endoplasmique se sont dispersés dans toutes les fractions. L'absence de marqueur de Golgi en immunobuvardage ne nous a pas permis de vérifier s'il existe une contamination du Golgi dans les autres fractions.

En réalisant des études de fractionnement subcellulaire, nous avons trouvé que la Pan-Cx43, qui représente les formes non phosphorylée et phosphorylées de la Cx43, est peu abondante dans la fraction cytosolique. Par contre, on retrouve les formes phosphorylées et particulièrement la forme non phosphorylée de la Pan-Cx43 dans les fractions du réticulum endoplasmique rugueux (RE), et du Golgi. On observe

également une forte association des formes non phosphorylée et phosphorylées dans la fraction lysosomiale.

En comparant les résultats obtenus par fractionnement subcellulaire avec les résultats en microscopie confocale, on observe que la NP-Cx43 et la calnexine ne présentent pas la même distribution à l'intérieur de la cellule en microscopie confocale. En effet, aucune co-localisation entre la NP-Cx43 ou la P-Cx43 et le marqueur de RE calnexine n'a été observée en microscopie confocale. Cette absence de co-localisation entre la Cx43 et le réticulum endoplasmique semble indiquer que la présence de la Pan-Cx43 observée dans la fraction RE du fractionnement subcellulaire provient d'une contamination de la fraction. L'absence de lamp-1 dans la fraction du RE indique que l'expression de la Pan-Cx43 dans la fraction du RE ne provient pas d'une contamination lysosomiale. Il est possible que la présence de la Pan-Cx43 dans la fraction RE provienne d'une contamination golgienne car nous avons observé une légère co-localisation entre l'appareil de Golgi (et plus particulièrement le *trans* Golgi) et la NP-Cx43 en microscopie confocale. Toutefois, l'absence de marqueur de Golgi en immunobuvardage ne permet pas de confirmer cette hypothèse.

L'association élevée de toutes les formes non phosphorylée et phosphorylées de la Pan-Cx43 dans la fraction lysosomiale du fractionnement subcellulaire indique que la voie de dégradation par les lysosomes est largement utilisée chez les cellules TtT/GF pour dégrader la Cx43. Les résultats sont confirmés en microscopie confocale car ils démontrent également une co-localisation partielle entre la NP-Cx43 et les lysosomes.

Les formes non phosphorylée (NP), mono- (1P) et di- (2P) phosphorylées de la Cx43 se retrouvent dans toutes les fractions subcellulaires. Aussi, la forme NP de la Cx43 semble être dominante dans les fractions du RE et du Golgi alors que toutes les formes sont largement représentées dans les lysosomes. Ces résultats indiquent que l'internalisation de la jonction gap dans les cellules TtT/GF et la fusion des endosomes avec les lysosomes pour la dégradation de la Cx43 précèdent la déphosphorylation de la Cx43.

Les résultats en fractionnement subcellulaire ne permettent pas de confirmer la présence de Pan-Cx43 dans la fraction golgienne. Par contre, la microscopie confocale démontre que la NP-Cx43 co-localise en partie avec les marqueurs de Golgi WGA et TGN38. Ces résultats démontrent que pour la Cx43, la voie de sécrétion implique un passage par le Golgi et le *trans* Golgi avant de se diriger vers la membrane plasmique. Par contre, aucune co-localisation n'a été observée entre la P-Cx43 et la calnexine et les marqueurs de Golgi en microscopie à fluorescence. La présence de formes phosphorylées de la Cx43 dans les fractions RE et Golgi du fractionnement subcellulaire indique que la Cx43 peut être phosphorylée avant d'atteindre la membrane plasmique mais que cette phosphorylation ne se situe pas sur la sérine 368.

4.2. MODULATION DE LA NP-Cx43 ET DE LA P-Cx43 DANS LES CELLULES TtT/GF PAR DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.

A) Effet des cytokines pro-inflammatoires sur l'expression et la localisation de la Cx43.

Nos résultats expérimentaux indiquent que l'IL-1 β et le TNF α augmentent l'expression de la Cx43 dans les cellules TtT/GF. En immunobuvardage, le traitement des cellules avec ces cytokines augmente l'expression de la NP-Cx43 après 1 heure d'exposition à l'IL-1 β et au TNF α dans la fraction membranaire. L'augmentation de l'expression de la P-Cx43 dans la fraction membranaire se produit après 2 heures de traitement à l'IL-1 β et après 1 à 2 heures de traitement au TNF α . Le taux de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 augmente dans la fraction cytosolique après 2 à 6 heures d'exposition à l'IL-1 β . Le traitement des cellules au TNF α augmente l'expression de la NP-Cx43 dans la fraction cytosolique après 2 heures d'exposition et celle de la P-Cx43 après 2 à 6 heures d'exposition au TNF α . En immunofluorescence, l'augmentation du marquage de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans la région périnucléaire se produit après 1 à 2 heures d'exposition à l'IL-1 β et se poursuit avec moins d'intensité jusqu'à 6 heures d'exposition. La présence de la P-Cx43 à la membrane plasmique augmente après 6 heures d'exposition aux cytokines. Le traitement des cellules TtT/GF avec le TNF α augmente la présence de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire pendant une période de 1 à 6 heures. Le marquage de la P-Cx43 à la membrane plasmique augmente de 2 à 6 heures après exposition au TNF α .

D'après plusieurs recherches concernant l'expression de la Cx43 lors de la réaction inflammatoire, il semble que l'influence des cytokines pro-inflammatoires sur le niveau d'expression de la Cx43 dépend du type cellulaire et donc de différentes voies de signalisation. Dans les cellules cardiaques, l'induction de l'inflammation par l'exposition des cellules au LPS (lipopolysaccharide, un antigène bactérien), et au $\text{TNF}\alpha$ réduit l'expression de la Cx43 au niveau transcriptionnel (Fernandez-Cobo et col., 1999). Par contre, on observe une augmentation de l'expression de la Cx43 dans les cellules du rein et des poumons lorsque celles-ci sont exposées au LPS ou à l' $\text{IL-1}\beta$ (Fernandez-Cobo et col., 1998). La transfection de Cx43 dans des cellules Hela permet de constater que le niveau d'expression de la Cx43 peut être augmenté via les voies adénylyl cyclase (AC)/AMPc/PKA, PKC et par la voie impliquant les récepteurs TNF via les protéines TRAFs et la p38-MAP-kinase (Salameh et col. 2003).

Nos résultats démontrent que des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la réponse inflammatoire augmentent l'expression de la Cx43 dans les cellules TtT/GF. De plus, l'étude cinétique en microscopie confocale de l'effet des cytokines $\text{IL-1}\beta$ et $\text{TNF}\alpha$ sur la localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 indique qu'il y a également co-localisation entre la NP-Cx43 et la P-Cx43 pendant le traitement. Cette co-localisation a lieu majoritairement sur la membrane plasmique et à un degré moindre dans la région périnucléaire. La présence d' $\text{IL-1}\beta$ semble augmenter la co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans la région périnucléaire après 6 heures d'induction. Par contre, le $\text{TNF}\alpha$ ne semble pas avoir d'influence sur le taux de co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43.

L'observation en microscopie confocale de la co-localisation de la Cx43 non phosphorylée en sérine 368 (NP-Cx43) avec la Cx43 phosphorylée en sérine 368 (P-Cx43) sur la membrane plasmique et dans la région périnucléaire des cellules TtT/GF semble de prime abord contradictoire. Toutefois, un connexon est formé de six connexines et il n'est pas exclu qu'un même connexon soit formé de plusieurs connexines présentant différents états de phosphorylation. Ces différents états de phosphorylation de la connexine pourraient intervenir dans la modulation de la conductance de l'hémicannal ou de la jonction gap et ainsi permettre une régulation de la communication intercellulaire. Une étude démontre que la phosphorylation de la sérine 368 de la Cx43 par la PKC induit un changement de conformation de la Cx43 (Bao et col., 2004). Si on considère que la phosphorylation de la Cx43 permet que chaque connexine présente sa conformation propre, ce phénomène pourrait donner lieu à une modification de la conductance au niveau du connexon ou de la jonction gap.

B) Effet de la cycloheximide sur l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF.

La communication intercellulaire peut être influencée par la demie-vie de la connexine, c'est-à-dire par la régulation de la synthèse et/ou de la dégradation de la protéine. Nos résultats indiquent que les cytokines pro-inflammatoires augmentent la concentration de NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF. Cette augmentation pourrait être due à une stimulation de la synthèse de la protéine, à une stimulation de son « turnover » ou bien à une altération de sa dégradation. Pour élucider la/lesquelles de ces possibilités avait lieu lors de l'incubation des cellules

TtT/GF avec les cytokines, nous avons étudié en premier lieu la possibilité d'une stimulation de la synthèse de la Cx43.

La cycloheximide (CHX) est un inhibiteur de la synthèse des protéines. L'utilisation de 20 µg/ml de CHX pendant 10 minutes diminue de plus de 96% la synthèse totale de protéines (ce qui inclus les connexines) (Musil et col., 2000). Selon les résultats que nous avons obtenus en immunofluorescence, l'exposition de cellules TtT/GF à 20 µg/ml de CHX provoque une diminution du marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire et ce, en présence ou non des cytokines pro-inflammatoires. On observe par contre une accumulation de la NP-Cx43 à la membrane plasmique en présence d'IL-1 β . De plus, l'utilisation de la CHX dans les cellules contrôle entraîne une diminution de l'association de la P-Cx43 à la membrane plasmique mais on observe une stabilisation de cette association dans les cellules traitées aux cytokines IL-1 β et TNF α . Il faut noter que dans ces cellules, les plaques de Cx43 sur la membrane plasmique sont plus petites que dans les cellules traitées avec les cytokines en absence de CHX. La diminution du marquage de la P-Cx43 dans la région périnucléaire en présence de CHX dans toutes les conditions indique que la CHX n'empêche pas la l'internalisation de la P-Cx43, sa translocation et sa dégradation par les lysosomes.

Les résultats que nous avons obtenus en immunobuvardage indiquent que dans les fractions membranaires des cellules contrôle, la CHX diminue de manière significative l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43. Ceci confirme nos résultats en immunofluorescence. Par contre, la diminution de l'expression de la NP-Cx43 et

de la P-Cx43 causée par la CHX n'est pas observée en présence d'IL-1 β ou de TNF α dans les fractions membranaires. Dans les fractions cytosoliques, l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 n'est pas affectée de manière significative par la présence de CHX mais on observe une diminution de l'expression de la NP-Cx43 en présence des cytokines et une diminution de l'expression de la P-Cx43 en présence de TNF α . Ceci encore une fois, confirme nos résultats en immunofluorescence. Par contre, la CHX ne diminue pas de façon significative l'expression de la P-Cx43 en présence d'IL-1 β .

La Cx43 est une protéine trans-membranaire et les résultats du fractionnement subcellulaire indiquent qu'il y a très peu de Cx43 dans la fraction cytosolique. La séparation des cellules en fractions membranaires et cytosoliques représente donc en fait des fractions enrichies en membranes et enrichies en cytosol. La présence de Cx43 dans les fractions « riches en cytosol » pourrait être le résultat d'une population de Cx43 retenue dans le RE ou dans l'appareil de Golgi. De plus, les fractions membranaires sont en fait des fractions riches en membranes c'est-à-dire qu'en plus de la membrane plasmique, une partie des membranes du RE, du Golgi et des lysosomes se retrouvent dans les fractions membranaires. Puisque dans les fractions « cytosoliques », on peut observer une diminution de l'expression de la NP-Cx43 dans les cellules exposées aux cytokines en présence de CHX, il est possible que la CHX bloque la synthèse de la NP-Cx43 induite par l'IL-1 β ou le TNF α ce qui est confirmé par les résultats en immunofluorescence. L'augmentation de l'expression de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire en présence de TNF α et d'IL-1 β pourrait donc être le résultat d'une augmentation de la synthèse de la Cx43 par ces cytokines. Par contre, l'augmentation de la co-localisation entre la NP-Cx43 et les lysosomes en

présence des cytokines semble indiquer qu'une grande partie de la Cx43 synthétisée se retrouve rapidement dans les lysosomes.

L'augmentation de l'association de la P-Cx43 à la membrane plasmique en présence des cytokines suggère que la présence des cytokines stabiliserait par phosphorylation la Cx43 lorsque celle-ci se retrouve à la membrane plasmique. Il est probable que l'IL-1 β soit en mesure de favoriser la forme 2P par phosphorylation de la Cx43 et que cette double phosphorylation et/ou la formation de jonctions gap fonctionnelles stabilise la Cx43 à la membrane plasmique. Des études ont prouvé que la conversion de la forme 1P en forme 2P se produit seulement après le transport de la Cx43 à la membrane plasmique et que la forme 2P est principalement concentrée dans les plaques formées par les jonctions gap (Musil et col., 2000). Il est possible que la sérine 368 soit impliquée dans la stabilisation de la protéine à la membrane plasmique. La majorité des phosphorylations de la Cx43 sur la sérine 368 se produit lorsque la Cx43 se retrouve à la membrane plasmique. On retrouve également une petite quantité de marquage de la P-Cx43 dans le cytosol mais sa distribution ne correspond pas au marquage de l'appareil de Golgi. Par contre, en microscopie confocale, on observe une légère co-localisation de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans la région périnucléaire. Ce marquage pourrait correspondre à une population de P-Cx43 associée aux lysosomes.

Nos résultats démontrent que l'utilisation de 20 μ g/ml de CHX inhibe la synthèse de la Cx43 dans les cellules TtT/GF en présence ou en absence des cytokines pro-inflammatoires. L'augmentation du marquage membranaire de la NP-Cx43 de

cellules traitées à l'IL-1 β en présence de CHX et la stabilisation du marquage de la P-Cx43 dans des cellules pré-incubées avec de la CHX et exposées à l'IL-1 β et au TNF α pourraient être expliquées par trois phénomènes : 1) l'IL-1 β et le TNF α induiraient la synthèse de la Cx43, 2) l'IL-1 β et le TNF α pourraient induire la phosphorylation de la Cx43 sur un autre site que la sérine 368 pour permettre la translocation de la protéine à la membrane (Cx43 1P). La localisation de la Cx43 à la membrane pourrait ensuite favoriser la phosphorylation de la Cx43 en sérine 368 (Cx43 2P). 3) Les cytokines pro-inflammatoires pourraient accélérer le turnover de la Cx43.

C) Le traitement des cellules TYT/GF avec l'IL-1 β et le TNF α augmente l'association de la NP-Cx43 avec les lysosomes.

Nos études en microscopie confocale indiquent qu'il n'y a pas d'augmentation de l'association de la NP-Cx43 avec le *trans* Golgi après 1 à 2 heures d'exposition aux cytokines. Par contre, une augmentation de l'association de la NP-Cx43 avec les lysosomes est observée pendant le traitement aux cytokines. L'augmentation de la co-localisation entre NP-Cx43 et lamp-1 survient au moins 1 heure après le début de l'exposition aux cytokines et se poursuit même après 24h d'exposition. L'augmentation de la présence de la NP-Cx43 dès 1 heure d'exposition à l'IL-1 β ou au TNF α semble indiquer que les cytokines pourraient diminuer la demi-vie de la NP-Cx43 en entraînant sa dégradation par les lysosomes. Il est possible qu'après la stimulation des cellules par les cytokines, la NP-Cx43 se dirige à la membrane plasmique et soit rapidement internalisée et dégradée par la voie des lysosomes. Ce phénomène pourrait être une conséquence indirecte du processus inflammatoire. Les

cellules FS sont reconnues pour être les seules cellules de l'hypophyse antérieure à sécréter de l'IL-6 (Renner et col., 1998). L'IL-1 β et le TNF α induisent la sécrétion d'IL-6 chez les cellules FS et l'IL-6 est reconnue pour stimuler la croissance des cellules FS dans l'hypophyse antérieure (Renner et col., 1998). Plusieurs études démontrent que l'utilisation de facteurs de croissance ou d'agents promoteurs de tumeur produit une diminution de l'expression de la connexine durant la croissance cellulaire (Maldonado et col., 1988, Lampe, 1994). La production d'IL-6 par les cellules TtT/GF en réponse à une stimulation par les cytokines IL-1 β et TNF α pourrait favoriser la dégradation de la Cx43 par la voie des lysosomes et sans doute également des protéasomes. Une seconde hypothèse serait que la NP-Cx43 nouvellement synthétisée est instable et se dirige directement vers les lysosomes. Ce phénomène a déjà été observé dans une lignée de cellules tumorales de sein incapables de produire suffisamment de jonctions gap fonctionnelles (Qin et col., 2003). La brefeldin A (BFA) est une drogue qui empêche le transport de la Cx43 du réticulum endoplasmique vers le Golgi. Une accumulation de la forme non phosphorylée de la Cx43 dans les lysosomes en présence et en absence de BFA a déjà été observée dans ces cellules.

D) La Cx43 est dégradée par la voie des lysosomes dans les cellules TtT/GF.

La leupeptine est un inhibiteur de protéases lysosomiales et donc de la dégradation des protéines par les lysosomes. L'utilisation de 100 μ g/ml de leupeptine inhibe la dégradation lysosomiale des protéines (Musil et col., 2000). Nos résultats démontrent qu'en présence ou en absence de cytokine, la leupeptine n'affecte pas le marquage de la NP-Cx43 dans la région périnucléaire. Cette région semble correspondre aux

lysosomes (lamp-1). Il se peut que les protéases lysosomiales en présence de leupeptine ne soient pas capables de dégrader la NP-Cx43. Par contre, la leupeptine augmente le marquage de la NP-Cx43 à la membrane plasmique en présence d'IL-1 β et de TNF α . On remarque également une accumulation de la P-Cx43 à la membrane plasmique dans les cellules traitées à la leupeptine et ceci en présence ou en absence des cytokines. Ces résultats indiquent une implication majeure des lysosomes dans la dégradation de la Cx43 par les cellules TtT/GF. Il semble qu'une partie de la NP-Cx43 destinée à être dégradée par les lysosomes peut maintenant se diriger et demeurer à la membrane plasmique en présence des cytokines. La présence de cytokines pourrait produire une phosphorylation à un site autre que la sérine 368 sur la Cx43 qui pourrait alors être transloquée à la membrane plasmique. Cette Cx43 phosphorylée (P1) est peut-être instable et est normalement destinée à être dégradée par les lysosomes. L'augmentation de la P-Cx43 associée à la membrane plasmique en présence de leupeptine indique qu'une partie de la P-Cx43 est dégradée par les lysosomes. Ces résultats prouvent que la leupeptine empêche la dégradation de la Cx43 en absence et en présence des cytokines.

E) Implication des protéasomes dans la dégradation de la Cx43 dans les cellules TtT/GF.

La dégradation de la Cx43 peut également s'effectuer par la voie des protéasomes (Qin et col., 2003). Pour savoir si les cytokines pro-inflammatoires avaient un impact sur la dégradation de la Cx43 par les protéasomes, nous avons incubé les cellules en présence de 15 μ M de lactacystine, un inhibiteur de protéasome. Les résultats démontrent qu'en présence de lactacystine on observe une accumulation de la NP-

Cx43 à la membrane plasmique en absence de cytokine. Ces résultats indiquent que la NP-Cx43 à la membrane plasmique est normalement une cible des protéasomes. La lactacystine n'a aucune incidence sur l'expression de la NP-Cx43 en présence d'IL-1 β ou de TNF α . Il est possible que l'augmentation de la NP-Cx43 induite par les cytokines ne soit pas dégradée par cette voie. La population de NP-Cx43 qui a atteint la membrane en présence des cytokines IL-1 β et TNF α pourrait aussi avoir été phosphorylée en sérine 368 ce qui expliquerait l'absence d'accumulation à la membrane plasmique de la NP-Cx43 en présence de lactacystine.

L'exposition des cellules à la lactacystine en présence ou en absence de cytokines augmente l'accumulation de la P-Cx43 à la membrane plasmique plus particulièrement aux contacts cellulaires. Cette accumulation est cependant moins perceptible chez les cellules incubées en présence d'IL-1 β possiblement parce qu'une grande quantité de P-Cx43 se trouvait déjà sur la membrane. Ces résultats démontrent l'implication des protéasomes dans la dégradation de la P-Cx43 dans les cellules TtT/GF. Dans le cas des cellules incubées en présence d'IL-1 β et de TNF α , il est probable qu'en présence de lactacystine, une partie de l'accumulation de la P-Cx43 soit en corrélation avec l'absence de la NP-Cx43 à la membrane plasmique retrouvée dans les cellules contrôle.

Le protéasome est un complexe généralement impliqué dans la dégradation de protéines mal repliées nouvellement synthétisées dans le réticulum endoplasmique. La dégradation par les protéasomes commence d'abord par l'ubiquitination de la protéine cible. La poly-ubiquitination est essentielle pour la reconnaissance de la

protéine cible par le protéasome 26S. Il existe cependant une autre forme d'ubiquitination qui elle, est impliquée dans des processus indépendants des protéasomes : la mono-ubiquitination (Hicke et Dunn, 2003). Une caractéristique de la mono-ubiquitination est qu'elle sert de signal pour l'internalisation de protéines membranaires. La phosphorylation de résidus sérines est reconnue pour réguler l'ubiquitination de résidus lysines de protéines cytosoliques et membranaires (Leithe et Revedal, 2004). La plupart des protéines ubiquitinées à la membrane plasmique sont par la suite la cible de la dégradation par les lysosomes. Une étude a prouvé que dans des cellules épithéliales de rat, l'induction de l'hyperphosphorylation de la Cx43 par du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acetate (TPA) entraîne une succession de mono-ubiquitinations de la Cx43 suivie de l'internalisation et de la dégradation de la protéine (Leithe et Revedal, 2004). Ce processus est sous la régulation de la PKC et de la MAPK et l'internalisation de la Cx43 est partiellement empêchée par la leupeptine et par des inhibiteurs de protéasomes. La Cx43 ubiquitinée prendrait alors la direction des lysosomes pour y être dégradée. Il existe également un mécanisme de poly-ubiquitination permettant aux protéines emmagasinées dans le *trans* Golgi de prendre la route directement vers les lysosomes (Hicke et Dunn, 2003).

Le mécanisme d'interférence des inhibiteurs de protéasomes pour la dégradation de la Cx43 n'est pas encore élucidé. Il est possible que les inhibiteurs de protéasomes empêchent l'ubiquitination de la Cx43 et donc son internalisation et sa dégradation. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi la leupeptine et la lactacystine sont toutes deux capables de prolonger la demie-vie de la Cx43. Elle

pourrait également expliquer l'accumulation de NP-Cx43 induite par l'IL-1 β et le TNF α dans les lysosomes en ayant passé ou non par la membrane plasmique.

4.3. L'IL-1 β ET LE TNF α AUGMENTENT LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE ENTRE LES CELLULES TtT/GF.

La communication intercellulaire varie selon les conditions physiologiques. Nos résultats démontrent une augmentation de la communication intercellulaire des cellules TtT/GF après 2 heures d'exposition à l'IL-1 β ou au TNF α . Il est reconnu que les cytokines ont la capacité de moduler le système endocrinien et que la production d'hormones par le système neuroendocrinien est capable de moduler la réponse immunitaire (Turnbull et Rivier, 1999). La régulation de l'inflammation et de l'immunité nécessite un réseau de communication entre les cellules et la présence de cytokines (Heemskerk et col., 1999). L'augmentation de la communication intercellulaire entre les cellules FS pendant l'inflammation pourrait donc jouer un rôle dans le contrôle de la sécrétion dans l'hypophyse antérieure.

L'injection de TNF α dans l'hypophyse antérieure d'ovin déclenche la production d'ARNm de l'hormone GH (Nash et col., 1992). L'injection d'IL-1 β ou d'IL-6 dans l'éminence médiane de rats provoque la sécrétion d'ACTH (Matta et col., 1992). Dans l'hypophyse antérieure, l'IL-6 provoque la stimulation de la sécrétion de plusieurs hormones incluant la LH, l'ACTH, la PRL et la GH *in vitro* et *in vivo* (Gorospe et Spangelo, 1993). Aussi, la PRL, l'ACTH et la GH sont des hormones reconnues pour être en mesure de moduler l'activité immunologique (Spangelo et Gorospe, 1995). Il est possible que l'IL-1 β ou le TNF α augmentent la communication

entre les cellules FS et synchronisent dans l'hypophyse antérieure la production de facteurs modulateurs de la sécrétion hormonale incluant l'IL-6. La synthèse et la sécrétion d'IL-6 ou d'autres facteurs par le réseau de cellules FS pourraient alors synchroniser la sécrétion d'hormones de l'hypophyse antérieure. Ce mécanisme permettrait au système endocrinien de s'adapter en augmentant la production de facteurs anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes et ainsi serait en mesure de moduler la réponse inflammatoire. L'utilité d'un système de communication intercellulaire dans l'hypophyse antérieure serait d'établir un mécanisme rapide de transmission d'information dans un organe déficient en innervation directe.

4.4. L'EXPRESSION DE LA Cx43 DANS L'HYPOPHYSE ANTÉRIEURE VARIE AU LONG DU CYCLE ANNUEL REPRODUCTIF DU VISON.

Le cycle annuel reproductif du vison est caractérisé par de nombreuses variations hormonales dans l'axe hypothalamo-hypophysaire. Notre laboratoire a démontré que la sécrétion de PRL variait selon les saisons et les périodes de lactation chez le vison femelle (Vitale et col., 2001). De plus, chez le vison mâle, on observe des variations dans le taux de testostérone et la sécrétion de GnRH durant le cycle annuel reproductif (Caillol et col., 1995). Nos résultats démontrent que l'expression de la NP-Cx43 et de la P-Cx43 dans l'hypophyse des visons adultes mâles est faible au mois de février et augmente de mai à août. Ces résultats démontrent une modulation de la Cx43 induite par des variations hormonales durant le cycle annuel reproductif du vison. Il est donc possible que des hormones provenant de l'axe hypothalamo-hypophysaire et des cytokines provenant du système immunitaire soient en mesure de moduler l'expression et la localisation de la Cx43 dans l'hypophyse antérieure. La régulation

de la communication entre les cellules FS de l'hypophyse antérieure serait un donc mécanisme potentiel pour assurer la coordination de la sécrétion à l'intérieur de l'hypophyse antérieure.

4.5. CONCLUSION

Pour conclure, il semble que des variations hormonales ou l'intervention du système immunitaire comme dans le cas d'une inflammation soient en mesure de modifier l'expression et la localisation de la Cx43 entre les cellules FS. Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α augmentent la synthèse de la Cx43. Malgré qu'une grande quantité de NP-Cx43 se retrouve rapidement dans les lysosomes, il semble qu'une partie de la Cx43 puisse atteindre la membrane plasmique et former des jonctions gap fonctionnelles. Ces changements permettent une augmentation de la communication entre les cellules FS. Dans un même temps, l'IL-1 β et le TNF α augmentent la proportion de Cx43 phosphorylée à la membrane plasmique et contribuent ainsi à la formation de jonctions gap. Toutefois, la phosphorylation de la Cx43 pourrait aussi contribuer à son internalisation et à sa dégradation par la voie des lysosomes. La forte co-localisation entre la forme non-phosphorylée de la Cx43 et les lysosomes en présence des cytokines pro-inflammatoires semble également indiquer qu'en cas d'inflammation, une grande proportion de la Cx43 non phosphorylée passe directement des vésicules de sécrétions aux lysosomes sans se diriger vers la membrane plasmique. Une observation semblable a été remarquée chez des cellules incapables d'établir de communication intercellulaire (Quin et col., 2003). Nos résultats indiquent que la majorité de la Cx43 synthétisée après exposition aux cytokines IL-1 β et TNF α est rapidement dégradée par les lysosomes. Donc, les

cytokines pro-inflammatoires augmentent la communication intercellulaire entre les cellules TtT/GF tout en diminuant la demie-vie de la Cx43. La dégradation de la Cx43 se ferait majoritairement par les lysosomes et par la voie des protéasomes dans les cellules TtT/GF.

De plus, les résultats de notre étude indiquent que la phosphorylation de la sérine 368 n'est pas nécessaire au transport de la Cx43 à la membrane plasmique. Il est possible que les cytokines pro-inflammatoires puissent phosphoryler la Cx43 sur un autre résidu que la sérine 368 et ainsi jouer un rôle dans la translocation de la protéine vers la membrane plasmique et favoriser la formation de la jonction entre deux cellules. Le rôle de la phosphorylation de la sérine 368 s'opère surtout au niveau de la conductance de l'hémicannal ou de la jonction communicante. La partie C-terminale de la Cx43 contient au moins 21 sérines et au moins 5 protéines kinases sont reconnues pour phosphoryler cette région de la protéine. Il serait intéressant de déterminer les autres sites de phosphorylation de la Cx43 et les kinases impliquées dans la phosphorylation de la protéine à la membrane et le rôle de ses phosphorylations lors de la réponse inflammatoire.

BIBLIOGRAPHIE

Allaerts W, Carmeliet P, Denef C. : New perspectives in the functions of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* **71** (1990) : 73-81.

Allaerts W, Jeucken PHM, Hofland LJ, Drexhage, HA. : Morphological, immunohistochemical and functional homologies between pituitary folliculo-stellate cells and lymphoid dendritic cells. *Acta Endocrinol* **125** (1991) : 92-97.

Allaerts W, Fluitsma DM, Hoefsmit ECM, Jeucken PHM, Morreau H, Bosman FT, Drexhage HA. : Immunohistochemical, morphological and ultrastructural resemblance between dendritic cells and folliculo-stellate cells in normal human and rat anterior pituitaries. *J Neuroendocrinol* **8** (1996) : 17-29.

Allen MB, Mahesh VB. : Chapter 4 : Ultrastructure of the pituitary gland. Dans *The pituitary A current Review*. Symposium on the Pituitary, Medical College of Georgia, 1976. New York : Academic Press, 1977.

Anthonsen MW, Solhaug A, Johansen B. : Functional Coupling between Secretory and Cytosolic Phospholipase A2 Modulates Tumor Necrosis Factor α - and Interleukin- 1β -induced NF κ -B Activation. *J Biol Chem* **276** (2001) : 30527-30536.

Aoki A, de Gaisan EO, Pasolli HA, Torres AI. Disposal of cell debris from surplus lactotrophs of pituitary gland. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104** (1996) : 256 -262.

Arzt E, Buric R, Stelzer G, Stalla J, Sauer J, Renner U, Stalla GK. : Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation : Effects of IL-2 (IL-2) and IL-6. *Endocrinology* **132** (1993) : 459-467.

Auernhammer CJ, Chesnokova V, Melmed S. : Leukemia Inhibitory Factor Modulates Interleukin- 1β -induced Activation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Endocrinol* **139** (1998) : 2201-2208.

Auron E.P. : The Interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **9** (1998) : 221-237.

Bao X, Altenberg GA, Reuss L. : Mechanism of regulation of the gap junction protein connexin 43 by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* **286** (2004) : C647-C654.

Benigni F, Fantuzzi G, Sacco S, Sironi M, Pozzi P, Dinarello CA, Sipe JD, Poli V, Cappelletti M, Paonessa G, Pennica D, Panayotatos N, Ghezzi P. : Six different cytokines that share gp130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* **87** (1996) : 1851-1854.

Bennett MVL, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC. : New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci*. **26** (2003) : 610-617.

Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC, Fein HG. : Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* **238** (1987):652-654.

Bilezikjian LM, Leal AMO, Blount AL, Corrigan AZ, Turnbull AV, Vale WW. : Rat Anterior Pituitary Folliculostellate Cells Are Targets of Interleukin-1 β and a Major Source of Intrapituitary Follistatin. *Endocrinology* **144** (2003) : 732-740.

Bodey B, Bodey B Jr, Kaiser HE : Dendritic type, accessory cells within the mammalian thymic microenvironment. Antigen presentation in the dendritic neuro-endocrine-immune cellular network. *In Vivo* **11** (1997) : 351-370.

Bradner JM, Houdek P, Hüsing B, Kaiser C, Moll I. : Connexins 26, 30, and 43 : Differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. *J Invest Dermatol* **122** (2004) : 1310-1320.

Braet K, Vandamme W, Martin PEM, Evans WH, Leybaert L. : Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. *Cell Calcium*. **33** (2003) : 37-48.

Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH. : Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N Engl J Med*. (1995) : 1323-1329.

Butkevich E, Hulsmann S, Wenzel D, Shirao T, Duden R, Majoul I. : Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol*. **14** (2004) : 650-658.

Caillol M, Mondain-Monval M, Rossano B, Solari A, Martinet L. : Annual variations of in vitro GnRH release by hypothalamic explants in intact and castrated male mink: relations with LH, FSH and testosterone circulating serum levels. *J Neuroendocrinol*. **7** (1995) : 681-687.

Carmeliet P, Vankelecom H, Van Damme J, Billiau A, Deneef C. : Release of IL-6 from anterior pituitary cell aggregates : Developmental pattern and modulation by glucocorticoids and forskolin. *Neuroendocrinology* **53** (1991) : 29-34.

Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hokfelt T. : Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *PNAS* **90** (1993) : 11292-11296.

Chapman L, Nishimura A, Buckingham JA, Morris JF, Christian HC. : Externalization of annexin I from a folliculo-stellate-like cell line. *Endocrinology* **143** (2002) : 4330-4338.

Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Saez JC. : Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *PNAS*. **99** (2002) : 495-500.

Cotrina ML, Lin JH, López-García JC, Naus CC, Nedergaard M. : ATP-Mediated Glia Signaling. *J Neurosci* **20** (2000) : 2835-2844.

Cunningham ET, Wada E, Carter DB, Tracey DE, Battey JF, De Soya EB : In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci* **12** (1992) : 1101-1114.

Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE. : Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol* **6** (1995): 813-22.

De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. : Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* **60** (1955) : 604-617.

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. : The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* **14** (2003) : 193-209.

Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Diaz MC, Belova N, Rettori V, McCann SM. : Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92** (1995) : 170-174.

Evans WH, Ahmad S, Diez J, George CH, Kendall JM, Martin PEM. : Trafficking pathway leading to the formation of gap junctions. De 1999 *Gap junction-mediated intercellular signalling in health and disease*. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 219) (1999) : 44-59.

Evans WH, Martin PEM. : Gap junctions : structure and function (Review). *Molec Memb Biol* **19** (2002) : 121-136.

Falk MM. : Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* **79** (2000) : 564-574.

Fauquier T, Guérineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P. : Folliculostellate cell network : A route for long distance communication in the anterior pituitary. *PNAS* **98** (2001) : 8891-8896.

Fauquier T, Lacampagne A, Travo P, Bauer K, Mollard P. : Hidden face of the anterior pituitary. *Trends Endocrinol Metab* **13** (2002) : 304-309.

Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, De Maio A. : Expression of the connexin 43 gene is increased in the kidneys and the lungs of rats injected with bacterial lipopolysaccharide. *Shock* **10** (1998) : 97-102.

Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, Drujan D, De Maio A. : Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. *Cytokine* **11** (1999), : 16-24.

Fletcher WA, Anderson NC, Everett JW. : Intercellular communication in the rat anterior pituitary gland. An in vivo and in vitro study. *J Cell Biol* **67** (1975) : 469-476.

Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC. : CCN3 (NOV) interacts with connexin 43 in C6 glioma cells: Possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem* **279** (2004) : 36943-36950.

Gemel J, Valiunas V, Brink PR, Beyer EC. : Connexin 43 and connexin 26 form gap junctions, but not heteromeric channels in co-expressing cells. *J Cell Sci.* **117** (2004) : 2469-2480.

Giometto B, Miotto D, Botteri M, Alessio L, Scanarini M, An SF, Tavolato B. : Folliculo-stellate cells of human pituitary adenomas : immunohistochemical study of the monocyte/macrophage phenotype expression. *Neuroendocrinology* **65** (1997) : 47-52.

Gloddek J, Pagotto U, Paez Pereda M, Arzt E, Stalla GK, Renner U. : Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J Endocrinol* **160** (1999) : 483-490.

Gon, G. : The origin of ciliated cell cysts of the anterior pituitary. An experimental study in the rat. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* **412** (1987) : 1-9.

Gorospe WC, Spangelo BL. : Interleukin-6 : Potential roles in neuroendocrine and ovarian function. *Endocrine J* **1** (1993) : 3-10.

Granot I, Dekel N. : Phosphorylation and expression of connexin 43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone. *J Biol Chem* **269** (1994) : 30502-30509.

Guilula NB, Reeves OR, Steinbach A. : Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature* **235** (1972) : 262-265.

Hassinger TD, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, Kater SB. : An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1996) : 13268–13273.

Heemskerk VH, Daemen MA, Buurman WA. : Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10** (1999) : 5-14.

Hicke L, Dunn, R. : Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and by ubiquitin-binding protein. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **19** (2003) : 141-172.

Hofer A, Dermietzel R. : Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia.* **24** (1998) : 141-54.

Horvath E, Vidal S, Syro LV, Kovacs K, Smyth HS, Uribe H. : Severe lymphocytic adenohypophysitis with selective disappearance of prolactin cells: a histologic, ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Acta Neuropathol* **101** (2001) : 631–637.

Inoue K, Matsumoto H, Koyama C, Shibata K, Nakazato Y, Ito A. : Establishment of a folliculo-stellate-like cell line from a murine thyrotropic pituitary tumor. *Endocrinol* **131** (1992) : 3110-3116.

Kagayama M. : The follicular cell in the pars distalis of the dog pituitary gland: an electron microscope study. *Endocrinology* **77** (1965) : 1053-1060.

Karanth S, McCann SM. : Anterior pituitary hormone control by interleukin 2. *PNAS* **88** (1991) : 2961–2965

Kariagina A, Romanenko D, Ren S.G., Chesnokova V. : Hypothalamic-pituitary cytokine network, *Endocrinology* **145** (2004) : 104-112.

Katayama T, Nakashima M, Kyan H, Murakami N, Kuroda H. : A role of pituitary adenylylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as a regulator of paracrine interactions between folliculo-stellate cells and gonadotropes through the control of activin-follistatin interactions. *The J Vet Med Sci* **62** (2000) : 731-736.

Kobayashi H, Fukata J, Murakami N, Usui T, Ebisui O, Muro S, Hanaoka I, Inoue K, Imura H, Nakao K. : Tumor necrosis factor receptors in pituitary cells. *Brain Res* **758** (1997) : 45-50.

Koffler L, Roshong S, Kyu Park I, Cesen-Cummings K, Thompson DC, Dwyer-Nield LD, Rice P, Mamay C, Malkinson AM, Ruch RJ. : Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. *J Cell Biochem.* **79** (2000) : 347-54.

Krutovskikh VA, Yamasaki H, Tsuda H, Asamoto A. : Inhibition of intrinsic gap-junction intercellular communication and enhancement of tumorigenicity of the rat bladder carcinoma cell line BC31 by a dominant-negative connexin 43 mutant. *Molecular carcinogenesis* **23** (1998) : 254-261.

Kumar NM. : Molecular biology of interactions between connexins. Gap junction-mediated intercellular signalling in health and disease. Dans : *1999 Gap junction-mediated intercellular signalling in health and disease. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 219)* (1999) : 6-21.

Kiriyama Y, Tsuchiya H, Murakami T, Satoh K, Tokumitsu Y. : Calcitonin induces IL-6 production via both PKA and PKC pathways in the pituitary folliculo-stellate cell line. *Endocrinology.* **142** (2001) : 3563-3569.

Laing JG, Tadros PN, Westphale EM, Beyer EC. : Degradation of Connexin 43 Gap Junctions Involves both the Proteasome and the Lysosome. *Exp Cell Res* **236** (1997) : 482-492.

Lampe PD. : Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication : a dramatic inhibition of assembly. *J. Cell Biol* **127** (1994) : 1895-1905.

Lampe PD and Lau AF. : Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* **384** (2000) : 205-215.

Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. : Phosphorylation of connexin 43 on serine 368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol* **149** (2000) : 1503-1512.

Lampe PD, Lau AF. : The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *IJBCB* **36** (2004) : 1171-1186.

Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, Martin MU. : The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein : a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol* **161** (1998) : 6871-6877.

Leithe E, Rivedal E. : Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment. *J Biol Chem*. 2004 Sep 14 [Epub ahead of print]

Li H, Liu TF, Lazrak A, Peracchia C, Goldberg GS, Lampe PD, Johnson RG. : Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol*. **134** (1996) : 1019-30.

Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. : The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med*. **189** (1999) : 1839-45.

Lo CW, Wessels A. : Cx43 gap junctions in cardiac development. *Trends Cardiovasc Med*. **8** (1998) : 264-269.

Lohrer P, Gloddek J, Nagashima AC, Korali Z, Hopfner U, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK, Renner U. : Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38 α mitogen-activated protein kinase/nuclear factor- κ B pathway. *Endocrinology* **141** (2000) : 4457-4465.

Maldonado PE, Rose B, Loewenstein WR. : Growth factors modulate junctional cell-to-cell communication. *J Membr Bio.* **106** (1988) : 203-210.

Martin PEM, Evans WH. : Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junction. *Cardiovasc Res* **62** (2004), 378-387.

Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. : Connexin 43 and connexin 45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res.* **90** (2002) : 1100-1107.

Martinez-Wittinghan FJ, Sellitto C, Li L, Gong X, Brink PR, Mathias RT, White TW. : Dominant cataracts result from incongruous mixing of wild-type lens connexins. *J Cell Biol.* **161** (2003) : 969-78.

Matta SG, Linner KM, Sharp BM. : A central mechanism is involved in the secretion of ACTH in response to IL-6 in rats : Comparison to and interaction with IL-1 β . *Neuroendocrinology* **56** (1992) : 516-525.

Maxeiner S, Kruger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K. : Spatiotemporal transcription of connexin 45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience.* **119** (2003) : 689-700.

Meme W, Ezan P, Venance L, Gowinski J, Giaume C. ATP-induced of gap junctional communication is enhanced by interleukin-1 beta treatment in cultured astrocytes. *Neuroscience* **126** (2004), 95-104.

Mese G, Londin E, Mui R, Brink PR, White TW. : Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss. *Hum Genet* **115** (2004) : 191-199.

Mesnil M, Krutovskikh V, Piccoli C, Elfgang C, Traub O, Willecke K, Yamasaki H. : Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res.* **55** (1995) : 29-39.

Moorby C, Patel M. : Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* **271** (2001) : 238-48.

Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y. : Cell-to-cell communication in the anterior pituitary : evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinol* **137**, (1996) : 3356-3367.

Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA. : Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol.* **111** (1990) : 2077-2088.

Musil LS, Le ACN, Vanslyke JK, Roberts LM. : Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* **275** (2000) : 25207-25215.

Nash AD, Brandon MR, Bello PA. : Effects of tumor necrosis factor- α on growth hormone and interleukin 6 mRNA in ovine pituitary cells. *Mol cell Endocrinol* **84** (1992) : R31-R37.

Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Mastumoto K : The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signaling pathway. *Nature* **398** (1999) : 252-256.

Nuttinck F, Peynot N, Humblot P, Massip A, Dessy F, Flechon JE. : Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev.* **57** (2000) : 60-66.

Oomizu S, Chaturvedi K, Sarkar DK. : Folliculostellate cells determine the susceptibility of lactotropes to estradiol's mitogenic action. *Endocrinol* **145** (2004) : 1473-1480.

Qin H, Shao Q, Igdoura SA, Alaoui-Jamali MA, Laird DW. : Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem.* **278** (2003) : 30005-30014.

Quist AP, Rhee SK, Lin H, Lal R. : Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J Cell Biol.* **148** (2000) : 1063-74.

Ray D, Melmed S. : Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* **18** (1997) : 206-228.

Reimold AM. : TNFalpha as therapeutic target: new drugs, more applications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* **1** (2002) : 377-92.

Renner U, Gloddek J, Arzt E, Inoue K, Stalla GK. : IL-6 is an autocrine growth factor for folliculostellate-like TtT/GF mouse pituitary tumor cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **105** (1997) : 345-352.

Renner U, Gloddek J, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK. : Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells. *Domest Anim Endocrinol.* **15** (1998) : 353-362.

Rinehart JF, Farquhar MG. : Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* **1** (1953) : 93-113.

Rinehart JF, Farquhar MG. : The fine vascular organization of the anterior pituitary gland. An electron microscopic study with histochemical correlation. *Anat. Rec.* **196** (1955) : 207-240.

Saez JC, Contreras JE, Bukauskas FF, Retamal MA, Bennett MVL. : Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol Scand* **179** (2003) : 9-22.

Salameh A, Polontchouk L, Dhein S, Hagendorff A, Pfeiffer D. : Chronic regulation of the expression of the gap junction protein connexin 43 in transfected HeLa cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **368** (2003) : 33-40.

Salazar H. : The pars distalis of the female rabbit hypophysis. An electron microscopic study. *Anat. Rec.* **147** (1963) : 469-497.

Sarma JD, Wang F, Koval M. : Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization. *J Biol Chem* **277** (2002) : 20911-20918.

Schechter J, Ahmad N, Weiner R. : Activation of anterior pituitary folliculo-stellate cells in the formation of estrogen-induced prolactin-secreting tumors. *Neuroendocrinology* **48** (1988) : 569-576.

Shah MM, Martinez AM, Fletcher WH : The connexin 43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: In vivo and in vitro studies. *Mol Cell Biochem* **238** (2002) : 57-68.

Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert DC. : Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary cells. *Microsc Res Tech* **39** (1997) : 138-149.

Solan JL, Fry MD, TenBroek EM, Lampe PD. : Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *J Cell Sci* **116** (2003) : 2203-11.

Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC and MacLeod RM : Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* **125** (1989) : 575-577.

Spangelo BL, Isakson PC, MacLeod RM. : Production of IL-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* **127** (1990) : 403-409.

Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM. : Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* **128** (1991) : 2685-2692.

Spangelo BL, Gorospe WC. : Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. *Front Neuroendocrinol.* **16** (1995) : 1-22.

Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. : Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* **277** (2002) : 10482-10488.

Tatsuno I, Somogyvari-vigh A, Mizuno K, Gottschall PE, Hidaka H, Arimura A. : Neuropeptide regulation of interleukin 6 production from the pituitary : Stimulation by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* **129** (1991) : 1797-1804.

Tomita M, Holman BJ, Williams LS, Pang KC, Santoro TJ. Cerebellar dysfunction is associated with overexpression of proinflammatory cytokine genes in lupus. *J Neurosci Res.* **64** (2001) : 26-33.

Tonon R, D'Andrea P. : The functional expression of connexin 43 in articular chondrocytes is increased by interleukin 1 beta : evidence of a Ca^{2+} -dependent mechanism. *Biorheology* **39** (2002) : 153-160.

Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwraz M, Willecke K : High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Current biology* **7** (1997) : 713-716.

Thomas MA, Zosso N, Scerri I, Demareux N, Chanson M, Staub O. : A tyrosine-based sorting signal is involved in connexin43 stability and gap junction turnover. *J Cell Sci.* **116** (2003) : 2213-2222.

Turnbull AV, Rivier CL : Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines; actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* **79** (1999) : 1-71.

Vandamme W, Braet K, Cabooter L, Leybaert L. : Tumour necrosis factor alpha inhibits purinergic calcium signalling in blood-brain barrier endothelial cells. *J Neurochem.* **88** (2004) :411-21.

Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Denef C. Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* **49** (1989) : 102-106.

Vila-Porcile E. : The network of the folliculo-stellate cells and the follicles of the adeno-hypophysis in the rat (pars distalis). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **129** (1972) : 328-369.

Vitale LM, Cardin J, Guilula NB, Carbajal E, Pelletier RM. : Dynamics of connexin 43 levels and distribution in the mink (*Mustela vison*) anterior pituitary are Associated with seasonal changes in anterior pituitary prolactin content. *Biol Reprod* **64** (2001) : 625-633.

Wang Z, Ren SG, Melmed S : Hypothalamic and pituitary leukemia inhibitory factor gene expression *in vivo*: a novel endotoxin-inducible neuro-endocrine interface. *Endocrinology* **137** (1996) : 2947–2953.

Warn-Cramer BJ, Lau AF. : Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1662** (2004), 81-95.

Wattiaux R, Wattiaux-De-Coninck S, Ronveaux-Dupal M, Dubois F. : Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J Cell Biol* **78** (1978) : 349-368.

Weber PA, Chang HC, Spaeth KE, Nitsche JM, Nicholson BJ. : The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. *Biophys J* **87** (2004) : 958-73.

Willecke K, Kirchhoff S, Plum A, Temme A, Thönnissen E, Ott, T. : Biological functions of connexin genes revealed by human genetic defects, dominant negative approaches and targeted deletions in the mouse. Gap junction-mediated intercellular signalling in health and disease. Dans : *1999 Gap junction-mediated intercellular signalling in health and disease*. Wiley, Chichester. (Novartis Foundation Symposium 219) (1999) : 76-96.

Wilfinger WW, Larsen WJ, Downs TR, Wilbur DL. : An *in vitro* model for studies of intercellular communication in cultured rat anterior pituitary cells. *Tissue Cell* **16** (1984) : 483–497.

Yamamoto T, Hossain MZ, Hertzberg EL, Uemura H, Murphy LJ, Nagy JI. : Connexin 43 in rat pituitary: localization at pituicyte and stellate cell gap junction and with gonadotrophs. *Histochemistry* **100** (1993): 53–64.

Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. : Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci.* **23** (2003) : 233588-233596.

Young, BA, Foster, CL, Cameron E. : Some observations on the ultrastructure of the adenohypophysis of the rabbit. *J Endocrinol.* **31** (1965) : 279-287.

Zhang YW, Nakayama K, Nakayama KI, Morita I. : A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2), *Cancer Res* **63** (2003) 1623-1630.

Zhang ZQ, Zhang W, Wang NQ, Bani-Yaghoub M, Lin ZX, Naus CC. : Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis.* **19** (1998) : 1889-94.

Zhang ZQ, Hu Y, Wang BJ, Lin ZX, Naus CC, Nicholson BJ. : Effective asymmetry in gap junctional intercellular communication between populations of human normal lung fibroblasts and lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* **25** (2004):473-82.